

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO**  
**COMPORTAMENTO**



**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO DE ENDOFENÓTIPOS EM ESQUIZOFRENIA:**  
**COGNIÇÃO E ENVELHECIMENTO PATOLÓGICO ACELERADO**

Diego Barreto Rebouças

Orientadora: Clarissa Severino Gama

Co-orientadora: Leticia Sanguinetti Czepielewski

Porto Alegre, 2018

Diego Barreto Rebouças

**Estudo de endofenótipos em esquizofrenia: cognição e  
envelhecimento patológico acelerado**

Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Doutor em  
Psiquiatria e Ciências do Comportamento,  
à Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Programa de Pós-graduação em  
Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarissa Severino  
Gama

Porto Alegre, 2018

Ben, chegaste em boa hora pra ver  
O mundo que gira veloz  
E a vida que corre demais

Ben, ouvi que você quer falar  
Sua mãe me contou que você tá demais  
E vendo suas fotos me bate saudade

Ben, um dia você vai crescer  
Cansar de brinquedo e jogar  
Voltar com a tristeza de baixo do braço

Que os dentes caem  
E as pernas crescem demais  
Fantasmas voam  
Depois que a luz se desfaz  
Mas não tem mistério, não  
Não tem por que chorar

Ben, não deixa de ouvir os discos que eu dei  
Não perde um bom dia de onda no mar  
Não deixa de me visitar, seu moleque safado

Ben, não liga pro que vão dizer  
Nem ouve conselho demais  
Nem mesmo as bobagens que eu te falo agora

Que os dentes caem  
E as pernas crescem demais  
Fantasmas voam  
Depois que a luz se desfaz  
Pessoas gritam  
Pessoas falam demais  
Mas não tem mistério, não  
Não tem por que chorar

A vida é boa  
Quando se brinca demais  
Quando se canta  
E não se olha pra trás  
Só não se esquece  
Que eu sou parceiro  
E sem mais

Para meu filho, Benjamin

## AGRADECIMENTOS

À professora Clarissa Gama pela oportunidade, apoio e pela persistência em ampliar conhecimentos científicos;

À minha co-orientadora Leticia Czepielewski, disponibilidade, parceria, perspicácia e pela entusiasmo com ciência;

Aos mestres da Universidade Federal do Ceará, pela excelente formação que me proporcionaram e pelos ensinamentos que levarei comigo na prática da profissão;

Aos professores e funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, PPG Psiquiatria e Ciências do Comportamento e da UFRGS pelo acolhimento e por proporcionar ensino de excelência, consistente e inovador;

Aos meus amigos Jader, Gisele, Lucas, Júlia, Rebeca e Rafael por ser minha família gaúcha, sempre me acolhendo e me dando apoio;

Às minhas colegas Juliana e Marina pela colaboração e dedicação;

Aos meus colegas de residência pelo companheirismo e pelo estímulo a sempre buscar mais e crescer;

Aos meus colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular;

Aos professores da banca pela disponibilidade em avaliar este trabalho;

Aos meus primos-irmãos Gilmário e Winnie pelo apoio e compreensão constantes;

À minha família, meus sogros e meu cunhado, meu irmão Renan, minha cunhada Bruna e meus sobrinhos Isaac e Inaê, pelo apoio e suporte;

Ao meu pai, por me ensinar persistência e honestidade e por me estimular a sempre ir mais além, sendo suporte para minhas conquistas;

À minha mãe, por sempre estar ao meu lado, com apoio incondicional e por me ensinar que sempre podemos superar momentos ruins;

À minha mulher Cinthia, que vem me acompanhando nestes últimos 14 anos por momentos bons e ruins, com apoio mútuo e recíproco, estimulando-me intelectual e afetivamente, por ter me acompanhado nas peripécias acadêmicas e por estar cultivando nosso querido Benjamin, que chegará no melhor momento de nossas vidas. Com você aprendi o que é o amor.

## Sumário

ABREVIATURAS E SIGLAS .....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. ESQUIZOFRENIA.....</b>	<b>15</b>
2.1.1. Etiologia.....	15
2.1.2. Morbimortalidade da doença.....	18
2.1.3. Alterações cognitivas .....	21
2.1.4. Alterações de marcadores biológicos.....	22
<b>2.2. NEUROBIOLOGIA DO DANO COGNITIVO NA ESQUIZOFRENIA .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3. ENVELHECIMENTO PATOLÓGICO ACELERADO .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. ENDOFENÓTIPOS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.5. MACHINE LEARNING .....</b>	<b>37</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>40</b>
<b>5. MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>6. ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>44</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
7.1. Artigo 1 .....	45
7.2. Artigo 2 .....	60
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>83</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## ABREVIATURAS E SIGLAS

**BPRS-** Brief Psychiatric Rating Scale (Escala breve de avaliação psiquiátrica)

**DM-** Diabetes mellitus

**DLPFC-** Córtex pré-frontal dorso lateral

**EVM** – Episodic verbal memory (memória verbal episódica)

**GPx** – Glutathione Peroxidase

**GWAS** - Genome-Wide Association Study

**HAS-** Hipertensão arterial sistêmica

**HLTV** - Hopkins Verbal learning Test

**LTD** – Long term depression (depressão de longa duração)

**LTP-**Long term potentiation (potenciação de longa duração)

**OS** – Oxidative Stress (estresse oxidativo)

**PCC** – Protein Carbonyl Content

**SB** – Unaffected siblings of schizophrenia (irmãos não afetados)

**SCID** - Structured Clinical Interview for DSM-IV

**SM-** Síndrome metabólica

**SNC-** Sistema nervoso central

**SZ** - Esquizofrenia

**TBARS** - Thiobarbituric Acid Reactive Substances

**THB-** Transtorno do humor bipolar

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Evolução da esquizofrenia com as fases da doença (pág. 14).

**Figura 2.** O possível papel das citocinas na neuroinflamação e neurogênese da esquizofrenia (pág. 16).

**Figura 3.** Risco de desenvolver esquizofrenia ao longo da vida de acordo com parentesco (pág. 17).

**Figura 4.** Descrição de funções cognitivas estudadas em indivíduos com esquizofrenia (pág. 22).

**Figura 5.** Representação esquemática do papel das citocinas nos processos celulares (pág. 25).

**Figura 6.** Mecanismos potenciais de disfunção cognitiva na esquizofrenia (pág. 28).

**Figura 7.** Mecanismos possíveis envolvidos no envelhecimento acelerado na SZ e correlações entre as variáveis achadas no estudo (pág. 30).

**Figura 8.** Inter-relação dinâmica entre fatores genéticos, endofenotípicos e ambientais no desenvolvimento da SZ (pág. 36).

**Tabela 1.** Complicações de síndrome metabólica (pág. 19).

**Tabela 2.** Relação entre antipsicóticos atípicos de segunda geração e anormalidades metabólicas (pág. 20).

**Tabela 3.** Condições relacionadas ao envelhecimento que ocorreriam em maior frequência na esquizofrenia (pág. 29).

**Tabela 4.** Possíveis endofenótipos e marcadores relacionados em esquizofrenia e transtorno do humor bipolar (pág. 34).

**Tabela 5.** Exemplos de uso de machine learning (pág. 37).



## RESUMO

A esquizofrenia (SZ) está classificada entre os transtornos mentais graves, sendo uma doença altamente incapacitante, com grande morbidade e mortalidade. O entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que ocorrem na esquizofrenia se fazem importantes no intuito de fornecer o substrato para melhores ações terapêuticas e, conseqüentemente, melhores desfechos clínicos. Uma maneira de avaliar tais mecanismos seria com estudos avaliando endofenótipos, que são características mensuráveis que se encontram entre o genótipo e a doença. Endofenótipos vêm sendo estudados em familiares não doentes de sujeitos com SZ com propósito de correlacionar fenótipo e risco genético. Sendo assim, baseando-se em características endofenotípicas, este trabalho busca compreender os mecanismos fisiopatológicos que ocorrem no dano neurocognitivo na doença (artigo 1) e caracterizar uma possível síndrome de envelhecimento acelerado patológico na SZ (artigo 2). Participaram do estudo 118 sujeitos: 35 pacientes com SZ, 36 irmãos não doentes de pacientes com SZ (SB) e 47 controles saudáveis (HC). O primeiro artigo avaliou uma possível correlação entre as citocinas TNF-a e IL-6 e memória verbal episódica, marcadores relacionados com consolidação da memória. A hipótese inicial seria a de que um desequilíbrio nestes marcadores levaria a prejuízo na memória verbal episódica, entretanto nos resultados não encontramos correlação significativa. Isto reforça uma outra teoria para o déficit na EMV. Esta teoria propõe que o prejuízo na EMV seria decorrente de alterações em funções cognitivas primárias, como o controle cognitivo proativo. Disfunções no controle proativo levariam ao déficit em EMV e não um desequilíbrio de TNF-a e IL-6. O artigo 2 investigou a ocorrência de uma síndrome de envelhecimento acelerado patológico na SZ e a possibilidade de tal característica poder ser um endofenótipo. Utilizou-se método de análise de dados baseados em inteligência artificial (Machine Learning), que utiliza algoritmos para fornecer resultados preditivos, tendo como principal medida a acurácia. Foi feito um algoritmo com os seguintes marcadores periféricos relacionados com envelhecimento celular: as eotaxinas CCL-11 e CCL-24; os marcadores de estresse oxidativo TBARS, GPx, PCC; e comprimento de telômero. O modelo foi capaz de separar com boa acurácia os três grupos individualmente, sugerindo que SZ e SB possuem alterações nestes marcadores significativas o suficientes para serem identificados. Estes resultados fortalecem a ideia de que realmente se ocorre um envelhecimento patológico acelerado na SZ e que esta característica pode ser um endofenótipo da doença, inclusive

também sendo observado em SB. Os achados desta tese ajudam a ampliar o conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos que ocorrem na esquizofrenia. Com o continuado crescimento deste conhecimento, espera-se que novos tratamentos e intervenções mais efetivas sejam desenvolvidos, buscando atenuar os desfechos tão debilitantes que ocorrem na doença.

## ABSTRACT

Schizophrenia (SZ) is a chronic severe mental disease characterized by great impairment in several areas of neurodevelopment, leading to high morbimortality. The understanding of its neurobiological mechanisms is important to provide ground for better therapeutic actions in order to achieve enhanced clinical outcomes. An interesting way of broadening the knowledge in this field would be with endophenotypes studies. Endophenotypes are identifiable components along the pathway between illness and genotype, allowing identification of some disorder features. These components have been studied in relatives of SZ subjects with the purpose of investigate the correlation between phenotype and genetic risk. Thus, in light of endophenotypic features, this work aims to evaluate the pathophysiological underpinnings that occurs in the cognitive impairment in the disease (article 1) and characterize a possible accelerated aging process in SZ as endophenotype (article 2). A total 118 individuals participated in the study: 35 subjects with SZ, 36 unaffected siblings of patients with SZ (SB) and 47 healthy controls (HC). The first article investigated the relationship between TNF- $\alpha$  and IL-6 and memory performance in patients with SZ, SB and HC. There were no significant correlations between episodic verbal memory, TNF- $\alpha$  and IL-6. These results strengthen the hypothesis that deficits in verbal memory of individuals with SZ could be secondary to inadequate functioning of cognitive processing areas, such as proactive cognitive control. The second article assessed pathological accelerated aging as an endophenotype in SZ using machine learning techniques combined with peripheral biomarkers related to the aging process. An algorithm using the following biomarkers was created: eotaxins CCL-11 and CCL-24; the oxidative stress biomarkers PCC, GPx and TBARS; and telomere length. The model was capable to individualize each group with good accuracy, suggesting that these profiles are significant enough to be identified in SZ and SB. These results support the hypothesis that a pathological accelerated aging truly occurs in SZ and that this pathological aging might be an endophenotype of the disease. Moreover, this profile was also observed in SB, pointing to the fact that SB might suffer from accelerated aging in some level. The enhanced understanding in this field might provide accurate multi-modal signatures to identify subjects in risk for endophenotypic manifestations and provide precocious intervention in order to reduce possible future deficits.

## 1. INTRODUÇÃO

Esquizofrenia é uma doença única, peculiar e com várias nuances. É um transtorno mental grave que afeta aproximadamente 1% da população, sendo incluída entre as doenças mentais crônicas altamente incapacitantes, juntamente com transtorno do humor bipolar e transtorno esquizoafetivo. É caracterizada por um série de sintomas que geralmente se iniciam na adolescência tardia ou vida adulta inicial e continuam ao longo da vida. A maioria dos pacientes se apresentam com comportamento disfuncional com dificuldade sociais e de aprendizado (1).

O diagnóstico inclui alucinações auditivas (geralmente vozes que conversam com ou sobre o paciente) e delírios (frequentemente um crença paranoide de que forças externas estão conspirando contra o mesmo). Além destes sintomas psicóticos, também chamados de sintomas positivos, vários déficits, ou sintomas negativos ocorrem. Dentre eles, inclui-se dificuldades de atenção, perda da sensação de prazer, perda de vontade para realizar atividades, desorganização e empobrecimento do pensamento e fala, embotamento afetivo e isolamento social. Sintomas positivos e negativos podem variar de intensidade ao longo da doença e pacientes podem apresentar predominância de um dos tipos de sintomas durante diferentes períodos, tornando a SZ um dos distúrbios mentais mais heterogêneos dentre as doenças psiquiátricas. A heterogeneidade dos sintomas e etiologia multifacetada refletem suas prováveis causas multifatoriais. Diversas áreas estão envolvidas na fisiopatologia da doença, neurais e não neurais, tornando o entendimento dos processos que ocorrem no transtorno bastante complexos (2).

Historicamente, Emil Kraepelin (1856-1926), pesquisador alemão comumente citado como criador da psiquiatria e genética psiquiátrica moderna, separava as psicoses em dois tipos: *dementia praecox* e psicose maníaco-depressiva. Diferenciava *dementia praecox* (sintomas demenciais em pacientes jovens) e a psicose maníaco-depressiva (conjunto de sintomas de agitação e melancolia) pelo seu curso (sintomas crônicos ou episódicos), manifestação predominante (alteração de pensamento ou humor) e prognóstico (deterioro ou remissão). Tal classificação de psicoses seria uma definição precedente da atual esquizofrenia (SZ) e transtorno do humor bipolar (THB), respectivamente. Curiosamente, a descrição de Kraepelin da SZ como *dementia praecox*, indica que o componente cognitivo é parte importante da doença, tanto que o próprio Kraepelin conceituava SZ como um transtorno de declínio cognitivo progressivo (3). Assim sendo, além dos sintomas positivos e negativos da doença, tem-se tornado cada

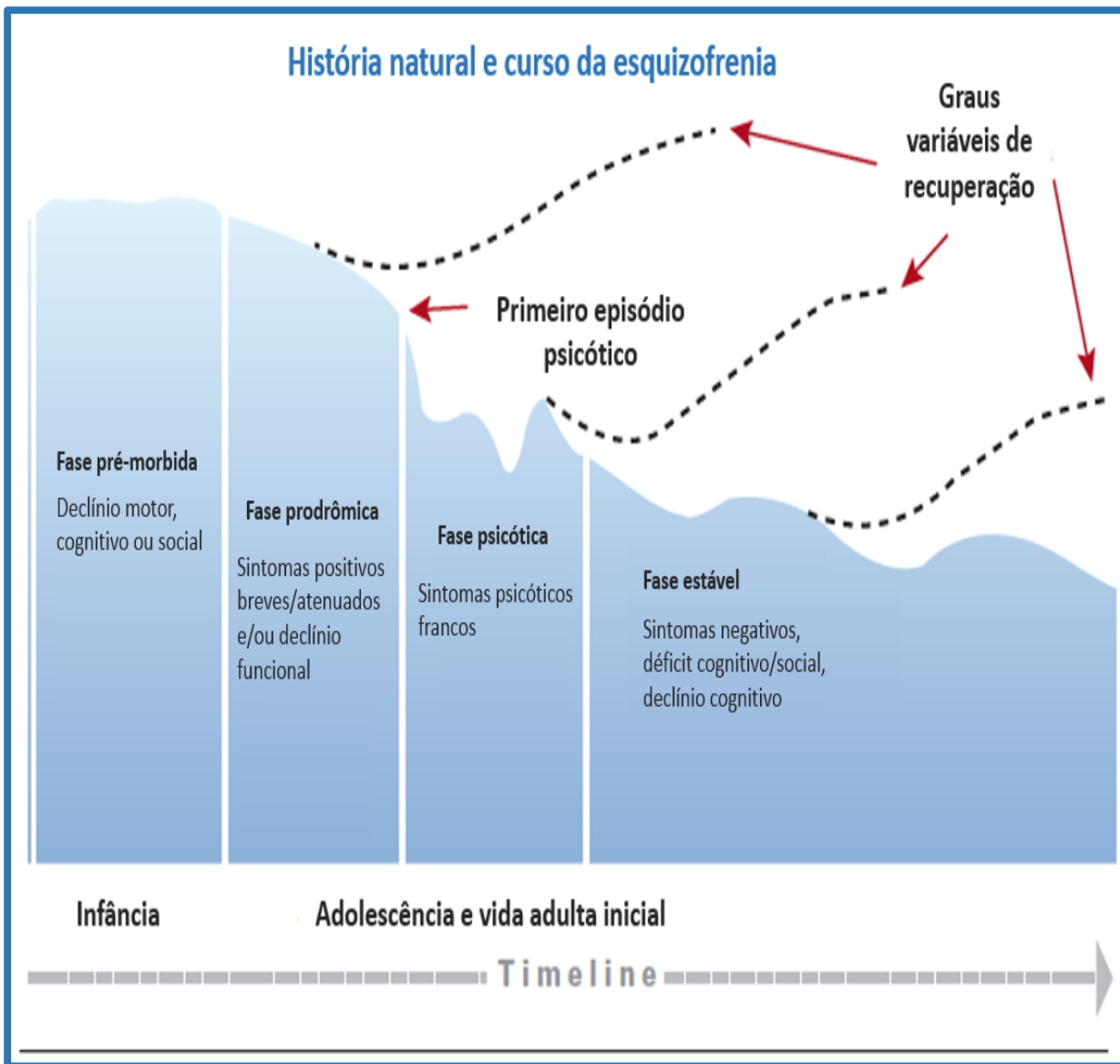
vez mais evidente que o transtorno é acompanhado de graus variados de prejuízo cognitivo, levando a hipótese de que funcionamento cognitivo na SZ é um dos componentes centrais da doença e não apenas uma consequência da mesma. Devido à importância de tal característica, propõe-se, inclusive, que os desfechos funcionais que ocorrem na SZ seriam melhor caracterizados pelo grau de prejuízos cognitivos que os pacientes apresentam, não pelos sintomas clássicos da doença (4).

Interessante salientar que uma das características observadas durante o envelhecimento normal seria exatamente algum grau de declínio cognitivo. O próprio Kraepelin (3) sugeria que as mudanças cognitivas que ocorriam durante o envelhecimento em SZ seriam consistentes com a hipótese da doença estar associada com envelhecimento patológico acelerado. Tal fato se correlaciona com características constatadas em SZ que seriam mortalidade precoce e um maior nível de morbidade (5). Estudos recentes vão em linha com esta hipótese e tem-se uma crescente gama de publicações que trazem consistência para esta hipótese (6).

Apesar da heterogeneidade de sintomas, a esquizofrenia é caracterizada por uma trajetória sequencial que envolve: fase pré-morbida, fase prodrômica, fase psicótica e fase estável (7) (**Figura 1**). Após o primeiro surto psicótico, o curso da doença varia substancialmente entre pacientes. Entretanto, classicamente o transtorno é marcado por exacerbações e remissões, com sintomas psicóticos entre episódios e durante a evolução da doença de intensidades variadas. Com a progressão da doença se pode evoluir com estados funcionais altamente debilitantes ou terminar em diferentes graus de recuperação. Frequentemente, pacientes com quadros progressivos crônicos apresentam grandes limitações funcionais, que os impedem de exercer atividades civis normalmente, necessitando de auxílios constantes.

Conforme o exposto acima, faz-se de extrema importância o estudo dos mecanismos subjacentes que ocorrem na SZ no intuito de realizar ações preventivas para evitar desfechos tão limitantes. Este estudo se propõe ampliar os conhecimentos sobre os possíveis mecanismos centrais que ocorrem na esquizofrenia.

**Figura 1.** Evolução da esquizofrenia com as fases da doença



Adaptado de Tandon et al, 2009 (7)

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. ESQUIZOFRENIA

#### 2.1.1. Etiologia

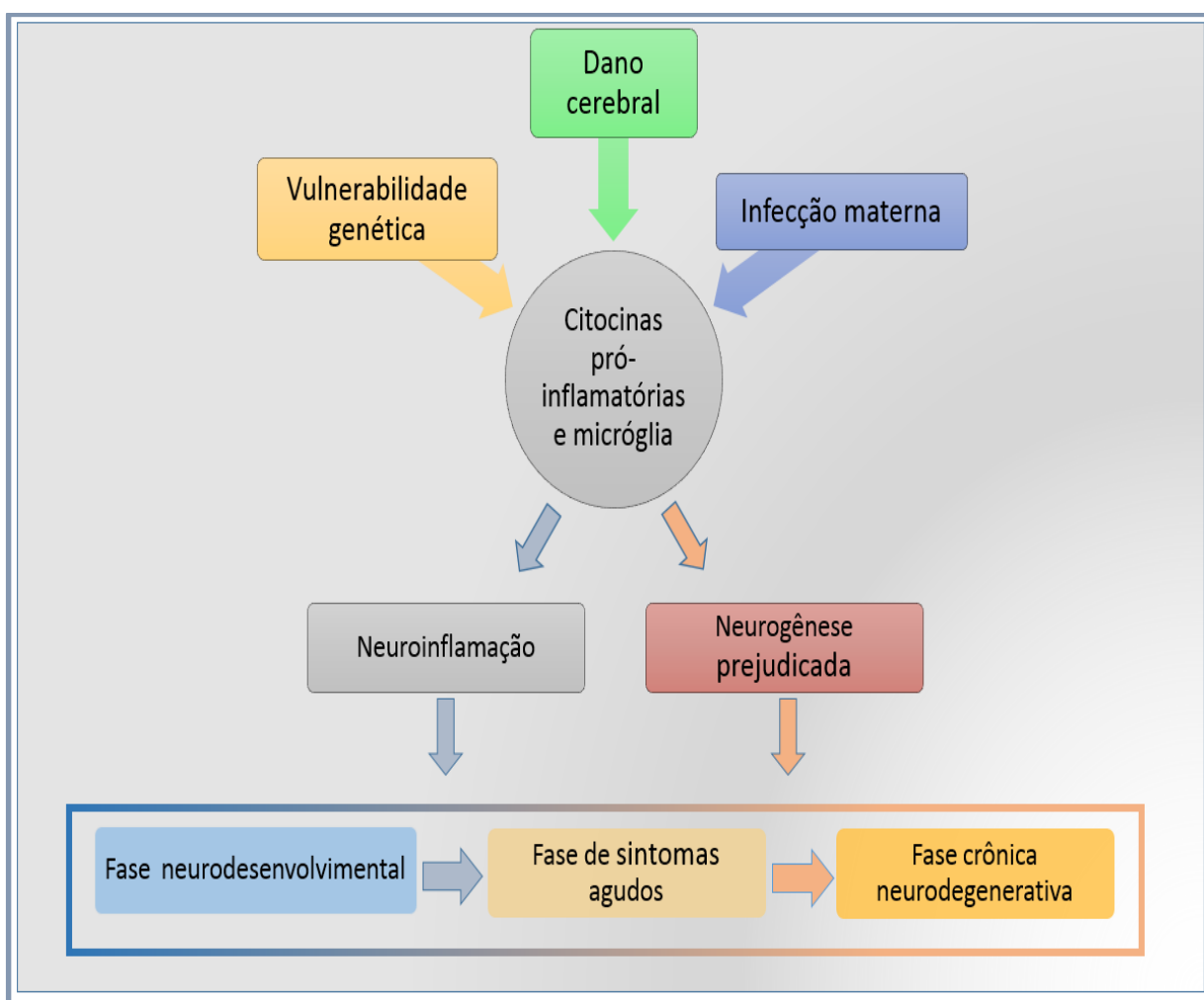
A origem etiopatológica da esquizofrenia ainda é desconhecida, entretanto, este é um campo que tem tido crescente produção científica. Anormalidades biológicas reportadas na SZ sugerem múltiplas vias causais, sem um único fator biológico como responsável por todos os casos. Possíveis causadores podem envolver a ativação precoce do sistema imune durante período pré-natal e respostas imunes anormais que contribuiriam para a fisiopatologia progressiva da esquizofrenia.

Apesar de as causas da doença ainda serem em grande parte desconhecidas, evidências ressaltam a importância de um desequilíbrio neuroprotetor-neurodegenerativo. Dentre os fatores que podem modular o delicado equilíbrio entre morte e sobrevivência neuronal, o papel das citocinas neste processo tem sido consistentemente relatado na doença. Dados que suportam esta teoria vêm de estudos evidenciando relações da SZ com doenças atópicas e autoimunes. Mostrou-se que transtornos atópicos na infância estão associados com maior chance de sintomas psicóticos na adolescência e que pacientes com SZ e seus irmãos não afetados pela doença tem maior prevalência de doenças autoimunes (8, 9).

Seguindo na mesma linha, sugere-se que infecções por patógenos também tenham um papel na fisiopatologia da doença. Sabe-se que tais infecções ativam o sistema imune e ativam uma cascata inflamatória a fim de combater o agente invasor. A SZ está associada a uma maior prevalência de vários tipos de infecção, dentre elas os vírus neurotrópicos da família *Herpes Viridae* e o parasita intracelular *Toxoplasma gondii*. Além disso, infecções durante o período pré-natal e durante o desenvolvimento infantil também estão associados com aumento no risco para desenvolver a doença na vida adulta. Importante salientar que foi constatado que infecções não apenas nos períodos pós-natais; mas também no período pré-natal, por qualquer patógeno, estão associadas a um aumento no risco de esquizofrenia na vida adulta. Alguns exemplos são: Herpes simplex vírus tipo-2, *T. gondii*, citomegalovírus, vírus da influenza e infecções bacterianas inespecíficas, como as do trato respiratório ou genital. Ademais, afecções do sistema nervoso central duplicam o risco de desenvolver a doença (10).

Os fatores citados acima sugerem um papel importante para marcadores inflamatórios na fisiopatologia da SZ, já que são processos em que ocorre ativação do sistema imune (**Figura 2**) (11). Dito isto, uma função para os marcadores inflamatórios no transtorno foi proposta na década de 90, com diversos estudos posteriores relatando alteração de citocinas e uma propensão à produção de citocinas pró-inflamatórias na SZ. Estudos mostram elevações das citocinas inflamatórias IL-1B, IL-6, TNF-a, e diminuição da citocina anti-inflamatória IL-10 (12). O papel das citocinas na fisiopatologia da SZ será discutido pormenorizadamente mais à frente desta tese.

**Figura 2.** O possível papel das citocinas na neuroinflamação e neurogênese da esquizofrenia



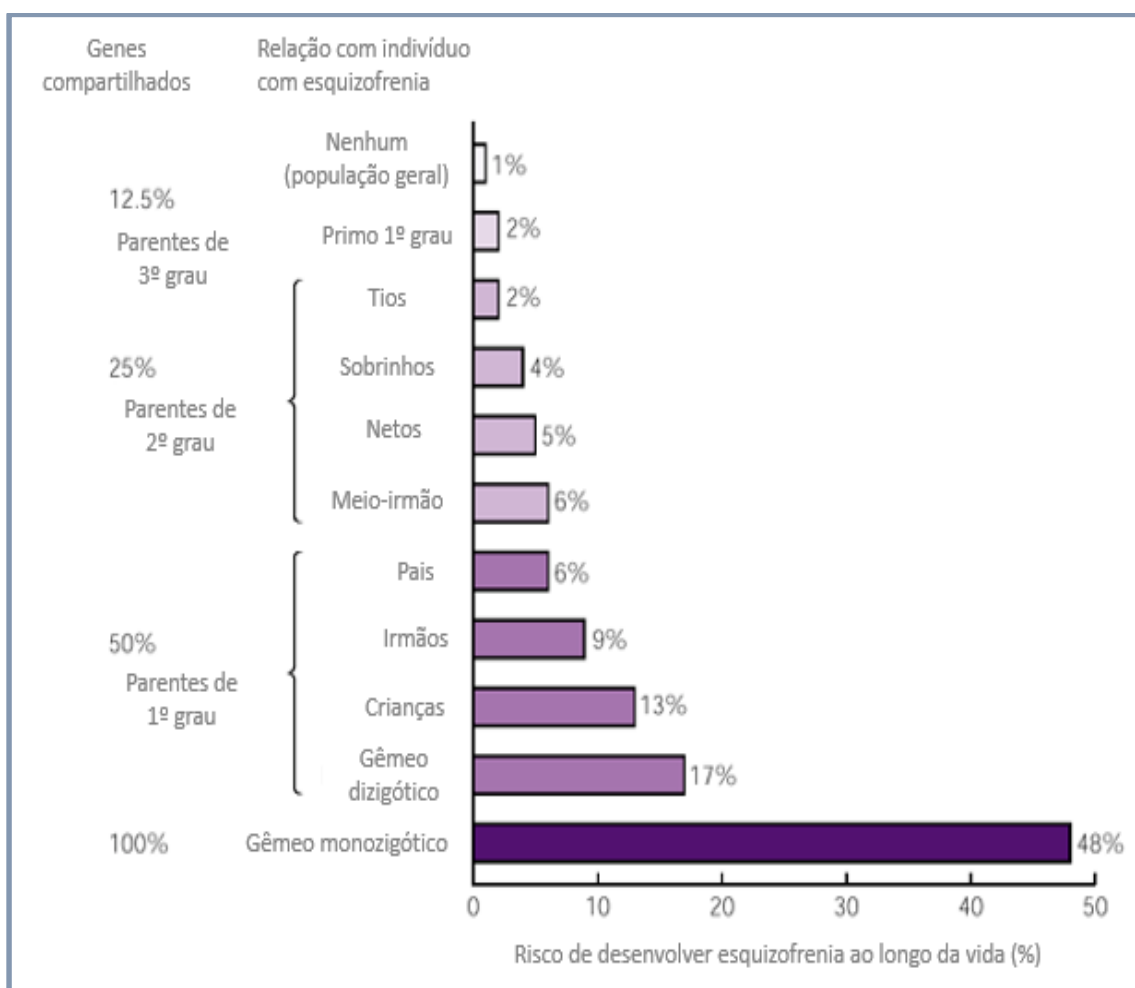
Adaptado de Na et al., 2014 (11)

Importante dizer que a SZ é uma desordem hereditária, com uma herdabilidade estimada de 80% e uma prevalência progressiva de acordo com o grau de parentesco com



o paciente (13). A **figura 3** mostra o risco de desenvolver SZ de acordo com parentesco. Diferentes genes e regiões cromossômicas vêm sendo estudados nos últimos anos no intuito de buscar uma relação genética com o transtorno. Uma revisão recente aponta uma série de achados importantes envolvendo variações do gene do componente do complemento 4 (C4) dos dados do GWAS na identificação de fatores de risco para esquizofrenia (14). Seguindo esta linha, estudos com endofenótipos, que buscam manifestações genóticas mensuráveis clinicamente, estão sendo realizados no intuito de ampliar tais conhecimentos (15).

**Figura 3.** Risco de desenvolver esquizofrenia ao longo da vida de acordo com parentesco



Adaptado de McGarth et al., 2013 (16) e Gottesman, 1991 (17)

À vista disto, evidências atuais expõem que o desenvolvimento da SZ poderia se dar a partir da associação entre vulnerabilidade genética e vulnerabilidade a múltiplos

fatores ambientais. A teoria dos dois *hits* no desenvolvimento da esquizofrenia propõe que se teria um primeiro *hit*, que seriam as vulnerabilidades genéticas, e um segundo *hit*, que seria decorrente de fatores ambientais. Logo, após o desenvolvimento do primeiro *hit* durante a formação genética, ocorreria um segundo *hit* no decorrer do desenvolvimento infantil, levando a evolução de sintomas psicóticos na adolescência/vida adulta inicial e posteriormente ao curso progressivo da doença com todas as suas características psicopatológicas (18). Fatores ambientais importantes relacionados com o segundo *hit* dentro da teoria do neurodesenvolvimento são, dentre outros: idade paterna avançada, deficiências nutricionais, nascimento no inverno, traumas, migração, fatores socioeconômicos, uso de cannabis e urbanicidade (13).

### 2.1.2. Morbimortalidade da doença

Pacientes com SZ têm expectativa de vida menor entre 10-25 anos e têm o dobro de mortalidade em relação à população geral. O suicídio é a maior causa de mortalidade na doença, chegando a acometer 1/3 de todos os casos de óbito. Os outros 2/3 das causas se enquadram dentro das mortes por causas médicas naturais (19). Ademais, fatores econômicos e sociais, como cuidados e hábitos de saúde precários, e efeitos colaterais de medicações desempenham um papel significativo nos desfechos clínicos desfavoráveis e no aumento do risco de doenças médicas graves que ocorrem na SZ. Curiosamente, mesmo com cuidados físicos e mentais adequados, o aumento da mortalidade se mantém, sugerindo que estes fatores devem não explicar a totalidade dos mecanismos que ocorrem na mortalidade precoce (20).

A esquizofrenia está associada com uma série de alterações metabólicas, independente do uso de antipsicóticos, especialmente diabetes mellitus (principalmente tipo II) e hipertensão arterial. As evidências da associação de SZ e DM vêm de: 1- estudos realizados antes do advento dos antipsicóticos, que sugeriam que haveria um aumento na incidência de intolerância à glicose na doença (21-23); 2- estudos que sugeriam que SZ estaria relacionado com DM independente do tratamento (24, 25); 3- estudos com familiares de pacientes que encontraram aumento na incidência de DM em parentes de sujeitos com SZ (26); 4- estudos mostrando aumento de glicose em pacientes em primeiro surto sem uso de antipsicótico (27, 28).

Consequentemente, pacientes com esquizofrenia também têm risco aumentado de desenvolver síndrome metabólica (SM). SM envolve adiposidade visceral, resistência

insulínica, aumento de pressão arterial, aumento de triglicérides e diminuição de HDL. SM aumenta risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e está relacionada com mortalidade precoce. A **tabela 1** mostra possíveis complicações da SM (29). Está associada com risco 4x maior de desenvolvimento de DM e aproximadamente 2x maior de doença cardíaca coronariana, acidente vascular cerebral e mortalidade precoce. Em relação à SZ, 1 a cada 2 pacientes tem sobrepeso, 1 a cada 5 tem hiperglicemia significativa e 2 a cada 5 tem anormalidades lipídicas (30).

**Tabela 1.** Complicações de síndrome metabólica

Sistema	Complicação
Cardiovascular	Doença coronariana, fibrilação atrial, insuficiência cardíaca, estenose aórtica
Hepatobiliar	Estenose hepática não alcoólica
Sistema nervoso central/psicológico	Acidente vascular cerebral isquêmico, envelhecimento cognitivo acelerado, irritabilidade, depressão, hostilidade
Câncer	Mama, cólon, bexiga, rim, próstata, carcinoma hepatocelular, colangioma intrahepático
Outros	Apneia obstrutiva do sono, psoríase

Adaptado de Yogaratnam et al, 2013 (29)

Um dos fatores associados a anormalidades metabólicas seria o uso de antipsicóticos (31). Dentre os antipsicóticos típicos, os de baixa potência (ex. clorpromazina e tioridazina) tendem a induzir maior aumento de peso que os de alta potência (ex. haloperidol e flufenazina). Dentre os antipsicóticos atípicos, clozapina e olanzapina têm maior propensão a induzir aumento de peso, quetiapina e risperidona com risco intermediário e aripiprazol, ziprazidona e amisulprida com menor risco (32) (**Tabela 2**). Um estudo comparando olanzapina e haloperidol em pacientes com primeiro episódio psicótico mostrou que, depois de 2 anos de tratamento, pacientes em uso de olanzapina tinham aumentado em média 15,4 quilos, enquanto que pacientes em uso de haloperidol aumentaram 7,5kg. Entretanto, apesar de alterações de peso, estudos mostraram redução de mortalidade geral de causas naturais e não naturais em pacientes com uso de clozapina (33). Ademais, estudos mostram aumento do risco de SM em

pacientes em primeiro episódio sem uso de antipsicótico prévio (34) e se tem evidências de alterações metabólicas em familiares de pacientes com esquizofrenia (35). Estes achados sugerem presença de fenótipos intermediários, que reforçariam a hipótese do risco aumentado de doenças clínicas estar relacionado com a própria fisiopatologia da doença.

Importante salientar que estudos mostram efeitos anti-inflamatórios dos antipsicóticos. Uma meta-análise demonstrou que os dados sumarizados pelos pesquisadores sugerem que o tratamento com antipsicóticos corrigem, pelo menos em parte, o estado inflamatório que foi documentado na SZ; porém, que os mecanismos pelos quais os antipsicóticos agem dentro do desequilíbrio imuno-inflamatório seguem desconhecidos e precisam ser melhor entendidos (36). Logo, tendo em mente que uma possível desregulação inflamatória que ocorre na SZ pode levar a processos de envelhecimento precoce, e por consequência, a doenças que ocorrem com o envelhecimento como HAS e DM, o uso de antipsicóticos poderiam ajudar no desequilíbrio inflamatório e minimizar os desfechos clínicos ruins. Além disto, pacientes em uso de medicação poderiam controlar melhor a doença e ter hábitos de vida mais saudáveis.

**Tabela 2.** Relação entre antipsicóticos atípicos de segunda geração e anormalidades metabólicas

Fármaco	Aumento de peso	Risco para DM tipo II	Piora do perfil lipídico
Clozapina	+++	+++	+++
Olanzapina	+++	+++	+++
Risperidona	++	++ / +	+
Quetiapina	++	++	++ / +
Aripiprazol	+ / -	+ / -	+
Ziprazidona	+ / -	+	+
Amisulprida	+ / -	-	-
Paliperidona	+	+	+

Adaptado de McIntyre et al, 2001 (32)

Portanto, quando pensamos globalmente nos possíveis déficits que ocorrem na esquizofrenia, como os desfechos clínicos ruins, dificuldades com manejo farmacológico

e efeitos colaterais, cronicidade e sintomas residuais, além de prejuízo em funções cognitivas e relações sociais, vemos como é uma doença que traz graves limitações funcionais (37). Limitações tão sérias que não é incomum de pacientes estarem aposentados por doença e com curatelas por não serem capazes de exercerem suas atividades civis. Por isso, a organização mundial de saúde classifica a SZ como uma das doenças que mais causam incapacidade funcional ao longo da vida (38).

### 2.1.3. Alterações cognitivas

Como dito anteriormente, o declínio cognitivo é um componente central na esquizofrenia. Interessantemente, alterações em funções cognitivas também têm sido relatadas em outros transtornos psiquiátricos graves; como, por exemplo, no transtorno do humor bipolar. Importante salientar que tais alterações diferem da esquizofrenia pela sua extensão e severidade. Pacientes com THB tendem a apresentar melhor performance cognitiva que pacientes com SZ (39).

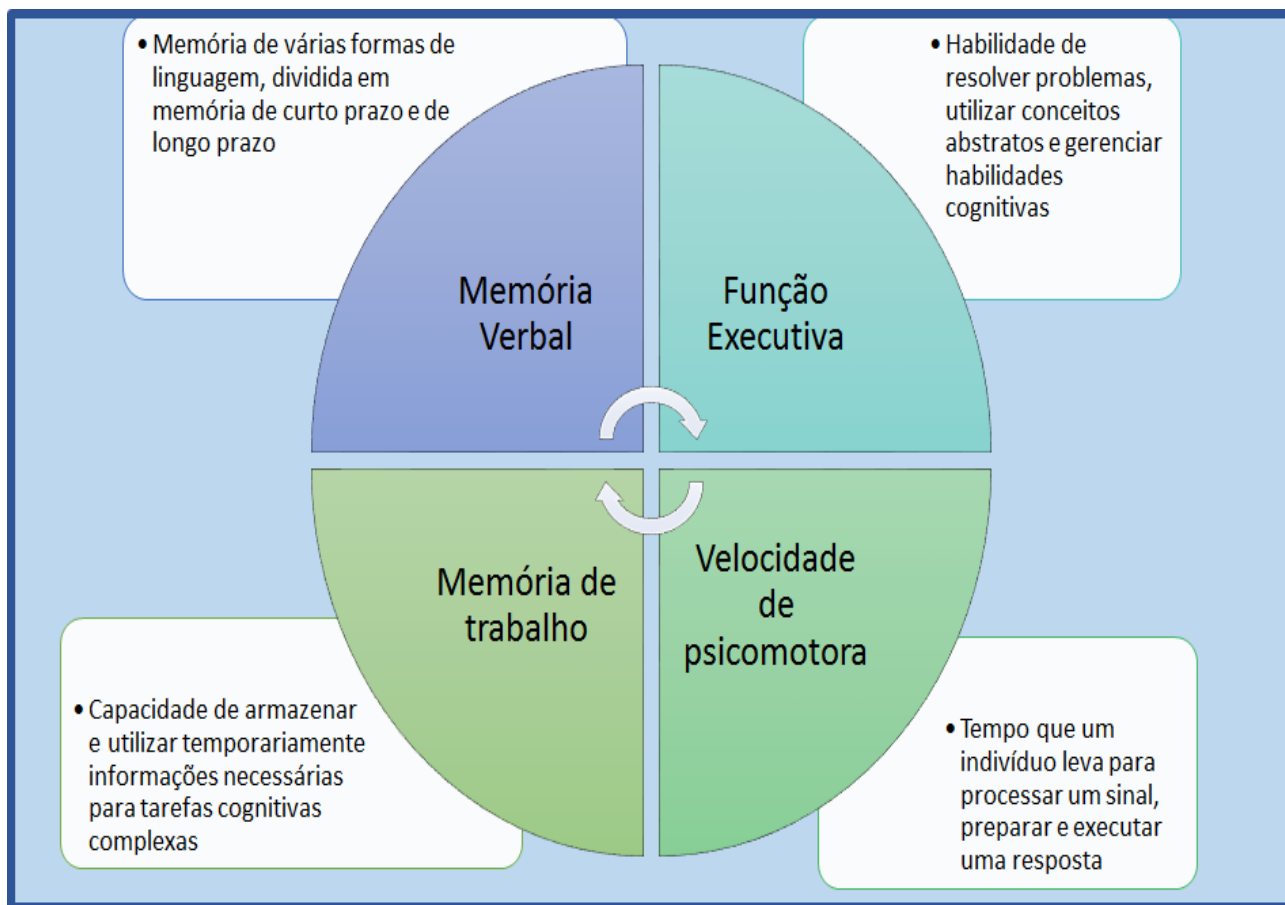
Indivíduos com SZ apresentam déficits em um amplo espectro, podendo variar de sintomas cognitivos leves à síndromes que mimetizam demências (40). Apesar de prejuízos heterogêneos em diversos domínios cognitivos, tem-se literatura consistente demonstrando comprometimento na função neuropsicológica em SZ, evidenciando-se declínio cognitivo global substancial (41). Tal característica fica mais evidente em pacientes com mais tempo de evolução da doença (42).

Os processos cognitivos englobam constructos complexos com diferentes subsistemas que afetam as funções cerebrais de maneiras distintas (43). Várias funções se encontram prejudicadas em pacientes com esquizofrenia, dentre elas: memória de trabalho, função executiva, velocidade psicomotora e memória verbal (**Figura 4**) (44).

Um dos principais domínios cognitivos afetados na SZ é a memória verbal episódica (EVM) (45). EVM é parte da memória declarativa, sendo responsável pelo armazenamento e recordação consciente de informação linguística e não-linguística, podendo se referir a eventos, experiências, situações ou novas associações que ocorrem na vida de cada um (4). O sistema de memória possui interligações com outros domínios cognitivos importantes, como linguagem e função executiva, influenciando significativamente outros processos cerebrais. Apesar de ter um neurodesenvolvimento tardio, EVM é mais susceptível ao dano neuronal que outros sistemas de memória, tendo um risco maior para deterioração precoce. Além disso, possui ampla conectividade com

áreas cerebrais corticais e subcorticais e se sobrepõe com outros processos neurobiológicos da memória (46).

**Figura 4.** Descrição de funções cognitivas estudadas em indivíduos com esquizofrenia



Adaptado de Ekerholm et al., 2012 (44)

Diversos estudos evidenciam que pacientes com esquizofrenia tem prejuízo na memória verbal episódica (47, 48), reforçando tal déficit como uma característica clínica importante na doença. Evidências apontam que prejuízos persistentes na EVM têm sido correlacionados com pior evolução da doença, tendo marcada importância por ser um preditor de funcionamento em pacientes com SZ, incluindo performance no trabalho, comportamento social e capacidade para atividades da vida cotidiana (49).

Pela sua importância nos desfechos cognitivos que ocorrem na progressão da doença, a memória verbal episódica tem sido proposta como potencial fator preditivo para desenvolvimento de psicose em sujeitos susceptíveis e incluída em modelos de estadiamento da doença (50).

#### 2.1.4. Alterações de marcadores biológicos

Citocinas são classificadas como um grupo de moléculas pleiotrópicas que são produzidos por várias células do sistema imunológico e não-imunológico e podem ter ação tanto no sistema nervoso central quanto no sistema periférico. Alguns exemplos incluem quimiocinas, interleucinas, interferons, linfocinas e fator de necrose tumoral. Estas moléculas multifatoriais têm diversas funções fisiológicas essenciais para manutenção de processos metabólicos e fisiológicos, como função de controle de resposta imune, plasticidade neuronal e preservação de homeostase corporal (51). Além disso, estudos mostram a importância das citocinas na regulação nos sistemas de neurotransmissores dopaminérgicos e serotoninérgicos, neurosistemas descritos na fisiopatologia de doenças mentais (52).

Apesar de não se saber especificamente quais anormalidades inflamatórias ocorrem nas doenças psiquiátricas, propõe-se que disregulação dos níveis de citocinas poderiam influenciar nos sintomas e evolução da doença. Tem-se literatura consistente evidenciando alterações de citocinas e SZ (53-55). Respostas nos sistemas imune tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) foram propostos para elucidar a fisiopatologia da SZ. Ainda que com resultados heterogêneos, relata-se uma mudança de resposta imune do tipo 2, caracterizada por um perfil anti-inflamatório, para uma resposta tipo 1, com perfil pró-inflamatório, sugerindo uma desregulação entre sistema imune celular e humoral. Na SZ, observa-se um aumento de TNF- $\alpha$ , citocina inflamatória regulada pela resposta Th1, e diminuição na atividade de IL-4 e IL-10, citocinas anti-inflamatórias reguladas pela resposta Th2, indicando desequilíbrio Th1/Th2 na doença (56).

Paradoxalmente, um importante marcador de resposta Th1, IL-2, tem um efeito “concentração-dependente” no sistema dopaminérgico, estimulando liberação de dopamina com níveis séricos baixos e inibindo liberação de dopamina com níveis séricos aumentados. Estudos mostram que este marcador Th1 teria uma tendência a estar diminuído na SZ (57). Outro fator seria um aumento de eotaxina-1 (CCL-11), citocina envolvida em ativação do sistema imune tipo 2, em indivíduos com SZ (58). Isto mostra a complexidade dos mecanismos imuno-inflamatórios na SZ, de modo que seria arriscado usar uma visão mais estreita e simplesmente afirmar que há um aumento de resposta Th1 e diminuição de resposta Th2, já que oscilações de citocinas também ocorrem dentro de cada grupo, como por exemplo com os marcadores do grupo Th1 TNF- $\alpha$  (aumentado) e IL-2 (diminuído).

Ademais, precisa-se ainda de dados mais consistentes em relação ao aumento ou

diminuição de citocinas ao longo da doença. Devido a estes resultados heterogêneos, alguns estudos sugerem subgrupos de pacientes que teriam níveis relativamente elevados de citocinas, podendo ter significado biológico mais consistente (59).

A **figura 5** mostra uma representação esquemática do papel das citocinas inflamatórias nos processos celulares. A ação destas citocinas poderiam estar no cerne dos mecanismos de progressão da doença, desde a fase assintomática, através de um período prodrômico, até o desenvolvimento de sintomas francos de SZ. O desequilíbrio da resposta imune estimularia apoptose celular e inibiria arborização dendrítica e neuroplasticidade, levando a dano estrutural e prejuízo funcional (10).

Pesquisadores buscam encontrar biomarcadores que possam refletir o estado clínico dos pacientes durante a progressão da doença. Sugere-se que níveis elevados de interleucina-1  $\beta$ , interleucina-6 e fator de transformação do crescimento- $\beta$  seriam marcadores de “estado” na SZ, estando aumentados em pacientes com agudizações da doença e em primeiro episódio psicótico, porém melhorando com uso de antipsicóticos e remissão de sintomas. Enquanto que interleucina-12, interferon- $\gamma$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e receptor solúvel de IL-2 seriam marcadores de “traço” da doença, já que os níveis séricos destes marcadores se manteriam elevados em agudizações e mesmo após tratamento com antipsicóticos e remissão de sintomas (12).

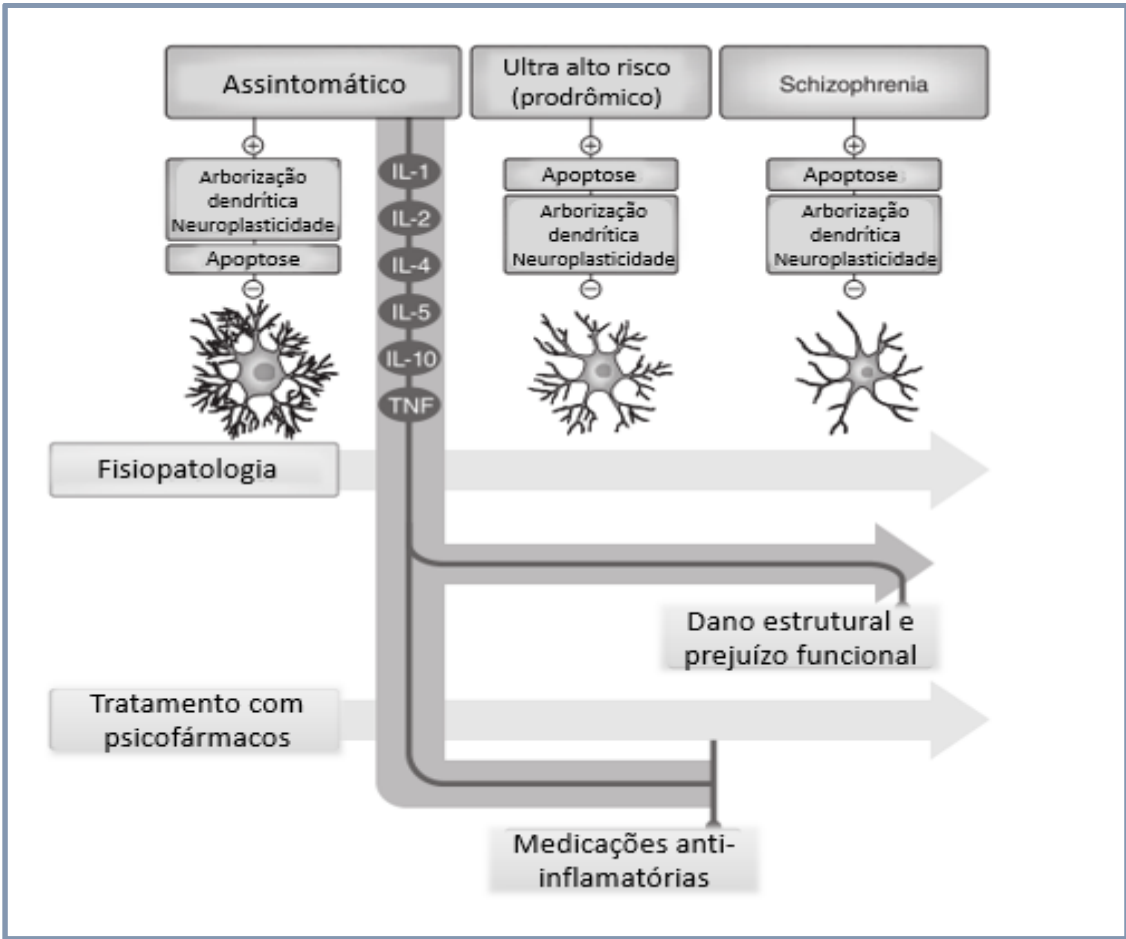
Além disso, tem-se literatura considerável mostrando não só alterações nas citocinas, mas também em áreas mais amplas do sistema imuno-inflamatório. Exemplos são: distúrbios nas células gliais cerebrais; níveis aumentados de anticorpos e de proteína C reativa; e alterações de quinureninas (11, 60).

Outros biomarcadores importantes que estão sendo estudados e que podem ter significância na fisiopatologia da doença são as eotaxinas, tipo de citocinas envolvidas na atração de células para local inflamatório; marcadores de estresse oxidativo, relacionados a dano celular e envelhecimento; e comprimento de telômero, marcador emergente associado com envelhecimento celular. Tais marcadores têm sido relacionados com teoria do envelhecimento patológico na SZ e serão abordados a posteriori nesta tese.

Devido ao possível papel significativo que marcadores inflamatórios e imunológicos exercem na fisiopatologia da SZ, patologias microvasculares e neuroinflamação têm sido sugeridos como possíveis endofenótipos que ocorrem na doença (61).

**Figura 5.** Representação esquemática do papel das citocinas nos processos celulares





Adaptado de Mansur et al., 2012 (56)

## 2.2. NEUROBIOLOGIA DO DANO COGNITIVO NA ESQUIZOFRENIA

Como já ressaltado previamente, esquizofrenia é uma doença complexa com prejuízo cognitivo e psicossocial importante. Recentemente, esforços foram feitos para entender melhor como ocorre o dano cognitivo na doença. Uma hipótese para tal prejuízo cognitivo seria que indivíduos com SZ apresentariam anormalidades biológicas nos mecanismos fisiológicos relacionados com a memória (10, 55, 62). A seguir, pormenorizamos como tais anormalidades se apresentariam.

Consolidação da memória é o mecanismo pelo qual as memórias são armazenadas permanentemente no cérebro. Este processo seria influenciado por dois processos celulares: potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD). Uma das teorias neurobiológicas mais aceitas diz que os neurônios ficariam “potencializados” ou altamente responsivos, por minutos, dias ou semanas através da LTP e LTD. Tais mecanismos influenciariam a conectividade sináptica, fortalecendo-a (LTP) ou tornando-a mais fraca (LTD) (63). Importante dizer que tanto a inibição de LTP quanto LTD podem levar a prejuízo nos sistemas de memória, e que o processo de aprendizagem modifica a indução destes mecanismos.

Um dos principais papéis exercidos pelas citocinas nos sistemas neuronais é a modulação do aprendizado e processos de memória. Evidências sugerem mecanismos inflamatórios como um fator importante nos processos que levam ao declínio cognitivo, inclusive envolvendo áreas mais amplas do sistema imuno-inflamatório (64). Dito isto, estudos em animais mostram uma possível influência das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  na plasticidade sináptica, LTP, LTD e neurogênese; sugerindo que tais substâncias teriam um papel importante na consolidação de memórias (65-67). A citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  tem efeitos neuroprotetivos e neurodegenerativos no cérebro. Tem a propriedade biológica de agir como um neuromodulador sináptico, influenciando a função cognitiva através de efeitos diretos na potenciação de longa duração (68, 69). A citocina IL-6 influencia a função cognitiva por efeitos na neurogênese e plasticidade sináptica através do bloqueio na neurotransmissão de LTP (69, 70).

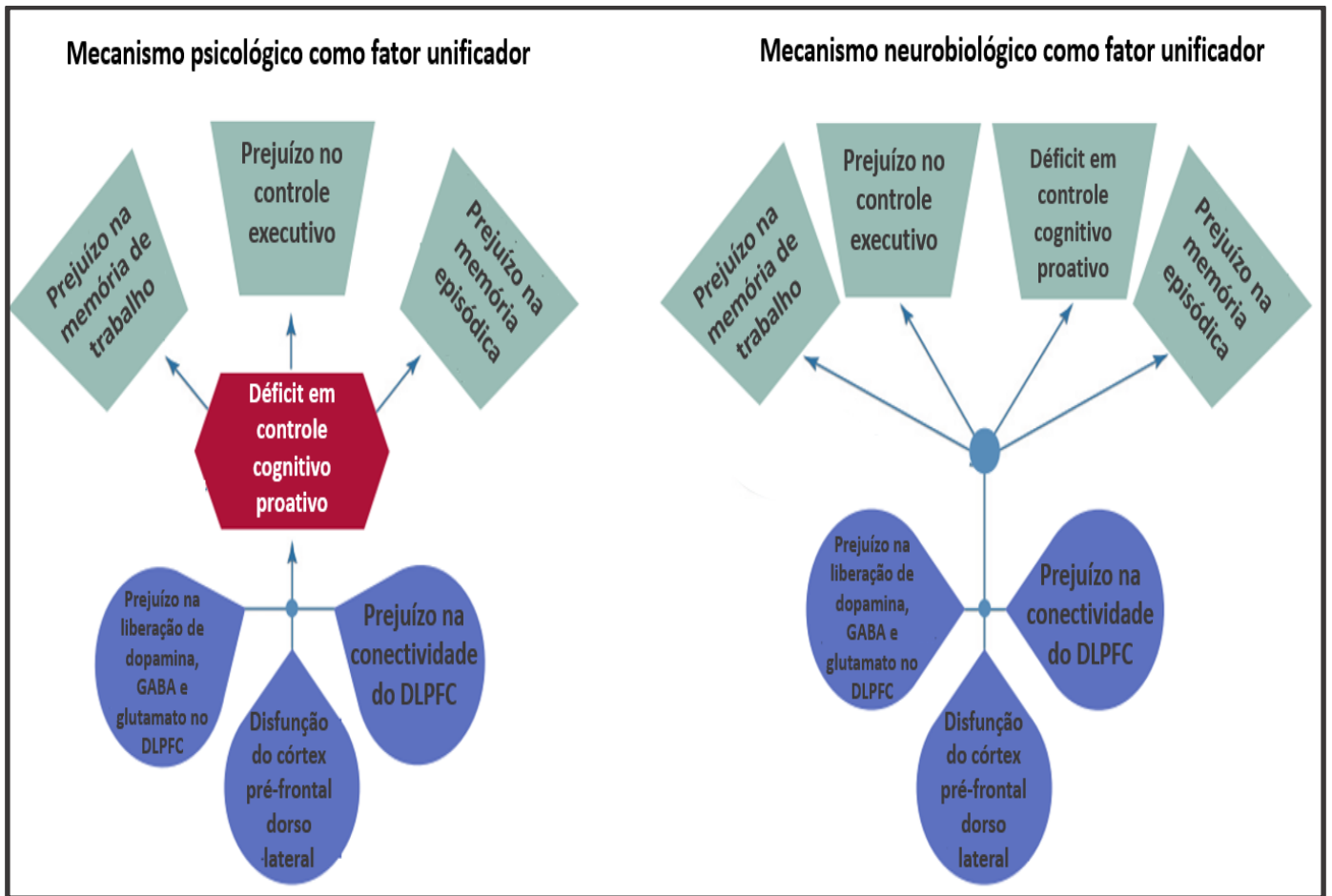
Entretanto, dada a complexidade dos mecanismos inflamatórios subjacentes que ocorrem nos sistemas de memória, resultados conflitantes ainda são descritos em estudos humanos, dificultando o entendimento do papel exato das citocinas no SNC (51). Dessa forma, uma revisão sistemática recente mostrou que um grupo de pacientes com as citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-8 e IL-2 mRNA) elevadas tiveram piores resultados em

testes cognitivos. Também evidenciou que a maioria dos estudos relataram resultados positivos em relação a TNF- $\alpha$  e desempenho cognitivo e que resultados menos convincentes foram vistos em relação à IL-6 (71). Todavia, salientam que os resultados avaliaram diversas áreas cognitivas e que se teve heterogeneidade significativa nas escalas utilizadas para avaliação do desempenho cognitivo, tornando difícil generalização. Ademais, avaliando-se as citocinas específicas TNF- $\alpha$  e IL-6 e memória verbal episódica, um dos componentes centrais da memória sabidamente prejudicado na SZ, obteve-se resultados inespecíficos.

Por conseguinte, considerando os resultados ainda inespecíficos relacionando citocinas e cognição, desenvolveu-se uma outra teoria para dano cognitivo não envolvendo desequilíbrio dos processos neurobiológicos da memória. Esta teoria sugere que os déficits que ocorrem na performance da memória em sujeitos com SZ seriam secundários a prejuízos em outras funções cognitivas, como em controle cognitivo proativo. Tal função é uma forma de processamento cognitivo responsável por reter ativamente informações importantes para manutenção da atenção e para processamento de elementos cognitivos (72). Portanto, a representação de informação de maneira ineficaz levaria a um processamento cognitivo “corrompido”, e como a memória episódica depende de um bom funcionamento dos processos de memória, alterações no controle proativo levariam a dano na memória verbal episódica e conseqüentemente nos processos cognitivos subsequentes.

Uma área relacionada com o controle proativo é o córtex frontal dorsolateral (DLPFC), sistema responsável pelo processamento contextual antes da ocorrência de eventos que demandem processos cognitivos (73). Importante dizer que déficits no controle proativo, juntamente com anormalidades no DLPFC, tem sido consistentemente relatados em SZ e que tais alterações estão associados com sintomas de desorganização na esquizofrenia (74, 75). A **figura 6** mostra potenciais mecanismos de disfunção cognitiva em esquizofrenia, tanto com um fator neurobiológico como fator unificador quanto com um mecanismo psicológico como fator unificador.

**Figura 6.** Mecanismos potenciais de disfunção cognitiva na esquizofrenia



Adaptado de Barch, 2012 (72)

### 2.3. ENVELHECIMENTO PATOLÓGICO ACELERADO

Indivíduos com esquizofrenia têm expectativa de vida menor que a população geral e frequentemente evoluem com desfechos clínicos graves. Uma teoria que sugere mecanismos para tais desfechos é a teoria do envelhecimento patológico acelerado. Kraepelin, em 1971, já sugeriria que o declínio cognitivo observado na doença poderia estar associado com algum grau de envelhecimento acelerado; e, em 2008, Kirkpatrick retomou os estudos envolvendo esta hipótese (5). Evidenciou os pobres desfechos clínicos que ocorrem na doença e discorreu sobre declínio cognitivo que ocorre na SZ, fazendo comparações com alterações que ocorrem no envelhecimento. O autor defende a hipótese de que haveria na SZ um aumento na prevalência de várias condições que ocorrem no envelhecimento (**Tabela 3**).

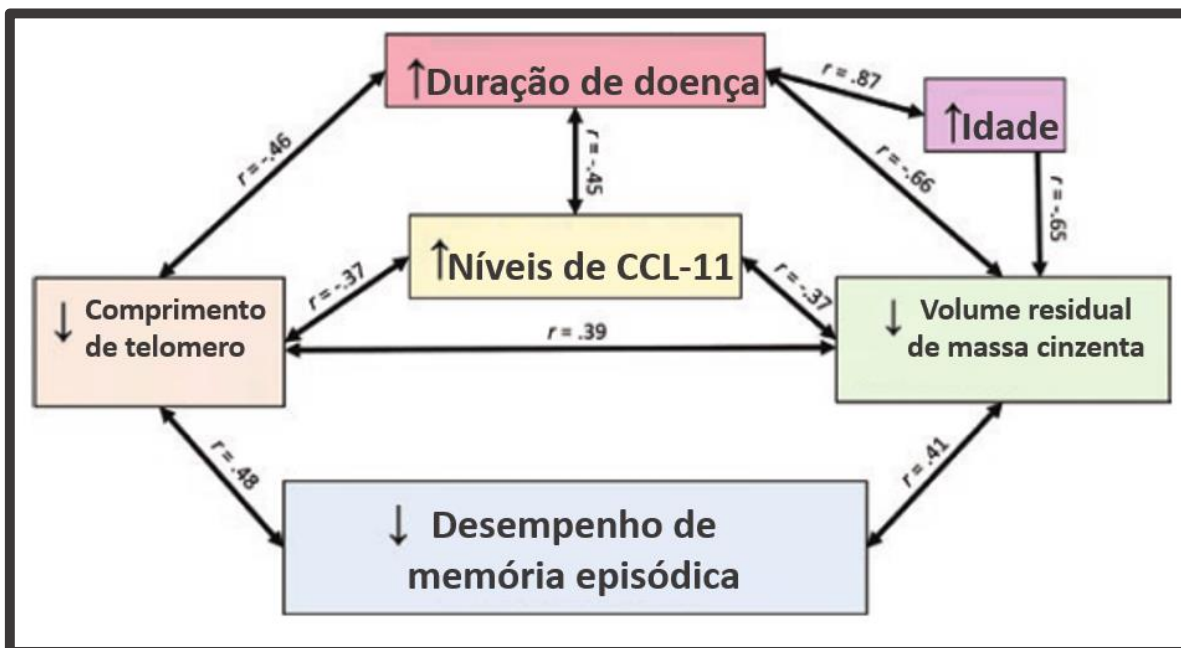
**Tabela 3.** Condições relacionadas ao envelhecimento que ocorreriam em maior frequência na esquizofrenia

Condições relacionadas com envelhecimento	
Aumento de resistência insulínica	Hiperlipidemia
Aumento de pressão arterial	Diminuição de densidade óssea
Espessamento da lente ocular	Afinamento e enrugamento da pele
Afinamento do cabelo	Diminuição de massa muscular

Adaptado de Kirkpatrick, 2008 (5)

Estudos recentes reforçam e ampliam esta teoria. Czepielewski et al, 2018 (76) avaliou envelhecimento acelerado na SZ e sugeriu alguns marcadores que podem fazer parte dos mecanismos fisiopatológicos que ocorrem neste possível endofenótipo. Os autores sugeriram um modelo multifatorial englobando marcadores biológicos, cognição e achados de neuroimagem. Avaliou-se a relação de envelhecimento com comprimento de telômeros, eotaxina-1 (CCL-11), volume de massa cinzenta e desempenho em memória episódica. A **figura 7** mostra possíveis mecanismos envolvidos em envelhecimento precoce acelerado na esquizofrenia.

**Figura 7.** Mecanismos possíveis envolvidos no envelhecimento acelerado na SZ e correlações entre as variáveis achadas no estudo



Adaptado de Czepielewski et al., 2017 (76)

Dentro do modelo de envelhecimento acelerado da figura 7, existiriam correlações positivas entre duração da doença, idade e níveis de CCL-11, e correlações negativas com comprimento de telômeros e volume residual de massa cinzenta; ou seja, além dos efeitos do envelhecimento normal, à medida que a doença evoluiria se teria aumento de CCL-11 e diminuição de telômero e massa cinzenta cerebral. Além disso, desempenho de memória episódica também teria um declínio, já que estaria relacionado positivamente com diminuição de comprimento de telômero e de massa cinzenta. Logo, tem-se um modelo complexo, envolvendo marcadores biológicos, testes psicométrico e exames de imagem que fortalecem esta hipótese.

Apesar de os estudos indicarem que estes processos sugiram um envelhecimento patológico acelerado, os mecanismos neurobiológicos destes processos seguem desconhecidos. Como já se tem literatura consistente evidenciando alterações cognitivas e de neuroimagem na SZ (77-80) e, como citado anteriormente, existem dificuldades de generalização de estudos com marcadores sanguíneos pelos resultados heterogêneos, um dos objetivos desta tese é ajudar a construir modelos com biomarcadores mais consistentes. Por isso, a seguir pormenorizaremos mecanismos celulares envolvidos com biomarcadores periféricos.

Envelhecimento celular é um estado do ciclo celular irreversível que contribui

ativamente para patologias degenerativas e senescência somática. Erosão de telômeros e disfunção mitocondrial são caminhos moleculares conhecidos implicados no processo de envelhecimento celular. Telômeros são estruturas constituídas por fileiras repetidas de proteínas de DNA não codificante que formam as extremidades dos cromossomos, cuja principal função é impedir o desgaste do material genético e manter a estabilidade estrutural do cromossomo. Em células somáticas normais, os telômeros diminuem de comprimento na medida em que ocorre divisão celular, quando o comprimento de telômero chega em seu nível crítico, a célula começa a entrar no processo de senescência e apoptose. Dito isto, comprimento de telômero é um marcador emergente de envelhecimento celular e tem sido associado com doenças médicas graves, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e câncer; portanto, sendo associado com mortalidade precoce (81). Ademais, apesar de se ter vários estudos avaliando telômeros com resultados controversos, resultados de uma meta-análise recente indicam que o comprimento de telômero está diminuído na esquizofrenia, sugerindo um perfil de envelhecimento acelerado na esquizofrenia (82).

Eotaxinas são citocinas envolvidas na atração de células para o local inflamatório relacionadas com desequilíbrio neuroinflamatório e com o processo de envelhecimento, originalmente implicados no recrutamento de células eosinofílicas para locais inflamatórios durante reações alérgicas, sendo investigado em doenças como asma, rinite alérgica e outras condições relacionadas com respostas eosinofílicas, e posteriormente visto funções mais amplas envolvendo outras células do sistema imunoinflamatório e neuromodulação de células cerebrais (83). Estudos animais mostraram que aumento de eotaxina-1 (CCL-11) está associado com diminuição de neurogênese na vida adulta e prejuízo de memória verbal (84). Estudos reforçaram estes achados mostrando aumento dos níveis de eotaxinas em pacientes com SZ, THB, depressão, distímia e transtorno do espectro autista e os relacionando com desfechos não favoráveis (58). Em relação especificamente a indivíduos com SZ, evidências confirmam tais achados e apontam para uma correlação negativa entre eotaxinas e desempenho cognitivo, principalmente para as eotaxinas CCL-11 e CCL-24 (85). Estas características tornam as eotaxinas potenciais candidatos para estarem diretamente envolvidos com processos patológicos de envelhecimento.

Outros marcadores biológicos importantes podem ter conexão com este processo de envelhecimento acelerado, são eles os marcadores de estresse oxidativo. Sugere-se que produtos de estresse oxidativo teriam um papel importante na fisiopatologia da

esquizofrenia (86, 87). A teoria do estresse oxidativo pressupõe que o processo de envelhecimento resulta do dano de radicais livres a tecidos conectivos e componentes celulares. Tais radicais livres seriam espécies químicas instáveis altamente reativas provenientes de reações associadas com oxigênio (88). Como o estresse oxidativo é uma das principais causas de desgaste dos telômeros e conseqüentemente de seu encurtamento, sugere-se que anormalidades ocorridas nos mecanismos de estresse oxidativo na SZ podem contribuir para o processo de envelhecimento acelerado (89).



## 2.4. ENDOFENÓTIPOS

O interesse por endofenótipos surgiu na biologia evolutiva em 1966, sendo descrito na literatura psiquiátrica por Gottesman e Shields em 1973, tendo sido definido como fenótipos intermediários situados entre o nível etiológico e o nível genotípico, ou seja, são componentes neurobiológicos mesuráveis que se encontram entre a doença e o genótipo. Tais características podem ser parâmetros neurofisiológicos, bioquímicos, endocrinológicos, neuroanatômicos ou cognitivos. A pesquisa neste tema é emergente, com crescentes publicações científicas, exemplificando: até 2002 tinha-se aproximadamente 60 resultados em busca no PUBMED relacionados com endofenótipos, enquanto que realizando-se a busca novamente até o ano de 2018, tem-se mais de 2500 resultados.

O conceito de endofenótipo foi proposto no intuito de explicar as complexidades dos mecanismos, intermediando as influências gênicas e ambientais sobre a expressão fenotípica. Assim sendo, um dos grandes usos da pesquisa endofenotípica seria correlacionar fenótipos com risco genético de uma doença. Critérios para identificação de marcadores genéticos na psiquiatria foram sugeridos e adaptados para se aplicar aos endofenótipos (90).

### **Critérios para endofenótipo:**

- 1- O endofenótipo está associado a uma doença na população
- 2- O endofenótipo é hereditário
- 3- O endofenótipo é independente do estado da doença, manifesta-se em um indivíduo mesmo sem a doença estar em atividade
- 4- Entre famílias, o endofenótipo e a doença são co-segregados
- 5- Os endofenótipos achados em familiares afetados pela doença são achados em familiares não afetados pela doença com maior frequência que na população geral

Interessante dizer que tais estudos não são restritos de pacientes com esquizofrenia. Os estudos de endofenótipos também abordam outras doenças psiquiátricas como transtorno do humor bipolar e depressão (91). Pearlson, 2015 (92) mostra uma tabela com os principais candidatos a endofenótipos e marcadores

relacionadas em SZ e THB (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Possíveis endofenótipos e marcadores relacionados em esquizofrenia e transtorno do humor bipolar

POSSÍVEIS ENDOFENÓTIPOS	
Movimento sacádico ocular	Eletroencefalograma em repouso
Ressonância magnética funcional – “task-based” e “resting state”	Mapeamento de cores DTI
Volume de massa cinzenta - ressonância magnética nuclear estrutural	Processamento de estímulo pareado/P50
Potencial relacionado a P300	Cognição

Adaptado de Pearlson, 2015 (92)

Em genética, locus se refere a uma posição específica de um cromossomo, como a posição de um gene ou um marcador genético. Cada cromossomo carrega muitos genes e conseqüentemente muitos loci (plural de locus). Um estudo recente de Smeland et al., 2017 mostrou uma correlação de 21 loci entre esquizofrenia e cognição (93). Dois loci foram associados com raciocínio verbal numérico, 6 com tempo de reação, 14 com função cognitiva geral. Um locus teve associação forte, gene TCF20, cromossomo 22q13.2, relacionando esquizofrenia com função cognitiva global e raciocínio verbal numérico. Ademais, correlacionaram 18 loci com pior performance cognitiva. Outro estudo recente por Li et al, 2017 identificou 30 novos loci em esquizofrenia, abrindo caminhos para descoberta de novas conexões entre loci e manifestações endofenotípicas (94). Os fatores genéticos, endofenotípicos e ambientais interagem entre si para gerar suscetibilidade para desenvolvimento da SZ. A **figura 8** mostra outros possíveis loci e esta inter-relação dinâmica.

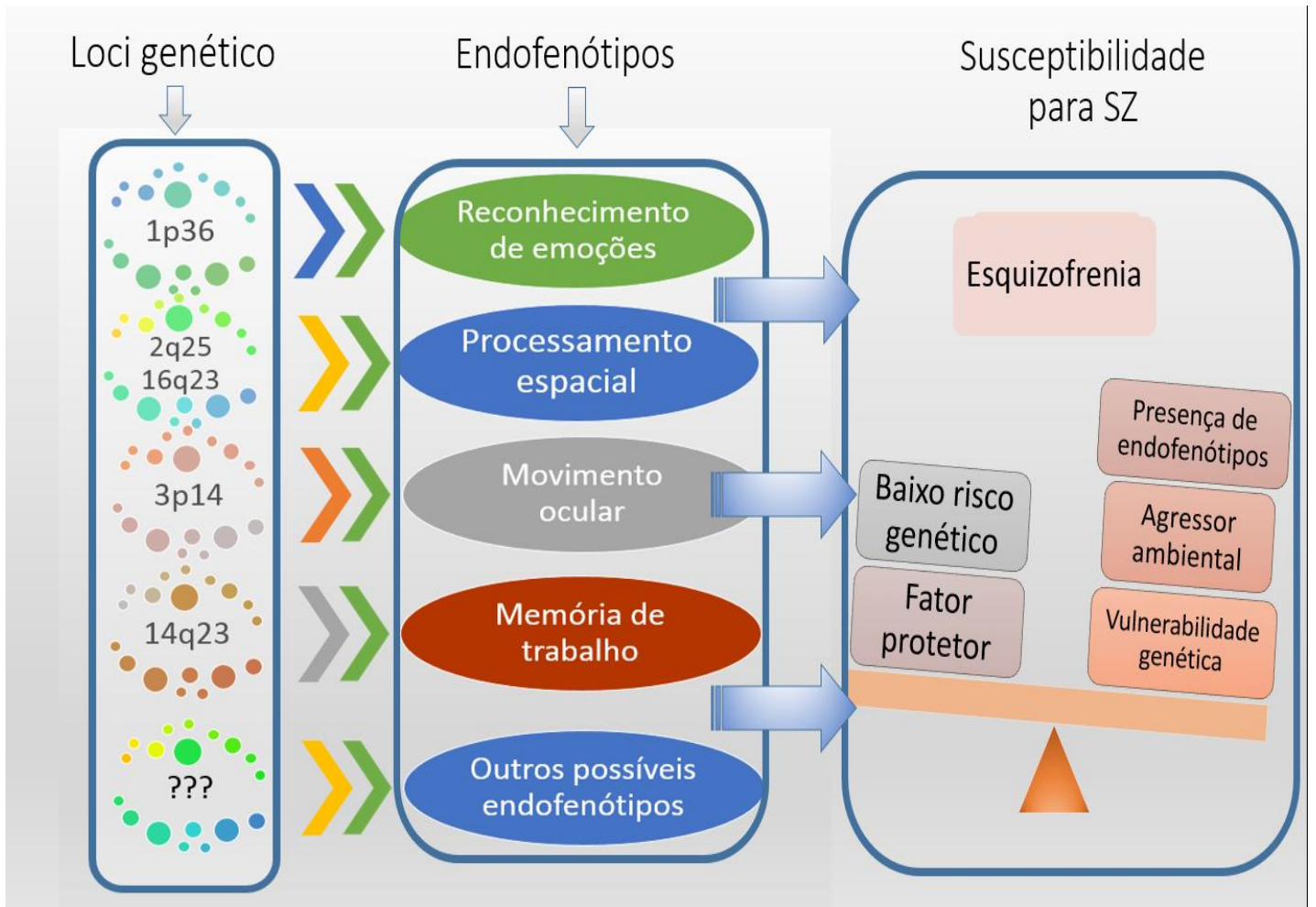
Uma maneira importante de se avaliar possíveis endofenótipos na SZ seria na avaliação de familiares de pacientes com a doença. Em virtude da significativa herdabilidade genética que ocorre, a presença de uma característica observada em SZ nos familiares não afetados pelo transtorno fortaleceria tal característica como possível

endofenótipo. À vista disso, estudos envolvendo familiares de pacientes estão em constante ascensão. Um estudo realizado por Massuda et al, 2013 (95) avaliou diferenças entre marcadores de estresse oxidativo em irmãos não afetados pela doença e controles saudáveis. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os dois grupos no tocante a níveis de conteúdo de proteína carbonil (PCC), com o grupo dos irmãos tendo maior nível sérico. Tais resultados reforçam o papel de marcadores oxidativos na SZ e na possibilidade de tais marcadores como endofenótipos. Seguindo nesta linha, outro estudo avaliou comprimento de telômeros em pacientes com SZ, SB e HC (96). Os resultados mostraram que sujeitos com SZ teriam menor comprimento de telômero em relação aos controles, porém em relação aos SB não se observou diferenças com ambos os grupos de SZ e HC. Estes resultados sugerem que irmãos de pacientes com SZ poderiam ter algum grau de diminuição no comprimento de telômero e, conseqüentemente, algum nível de envelhecimento patológico, podendo esta característica vir a ser um endofenótipo.

Outros estudos com familiares de pacientes robustecem a ideia de funções cognitivas com endofenótipos (97, 98). Um estudo por Massuda et al., 2013 (99) mostrou que SB tiveram pior performance cognitiva que controles saudáveis em relação a memória verbal episódica. Além disto, exames com neuroimagem também evidenciam anormalidades em SB comparados com HC, especialmente na conectividade cerebral e nos modos de estado de repouso (100-103). Curiosamente, estes critérios estão se expandindo até mesmo para o período perinatal, como mostra o estudo de Ross e Freedman, 2015 (104), sugerindo novos critérios de endofenótipos para o período perinatal e como estes novos critérios ajudam a identificar fenótipos perinatais úteis para risco de SZ.

Como se pôde perceber, os estudos com endofenótipos abrangem diversas áreas neurobiológicas, englobando desde parâmetros cognitivos e neuroanatômicos a características neurofisiológicas e bioquímicas. Os estudos de endofenótipos possibilitam “ligar os pontos” entre os genes, as células, circuitos biológico, neurocognição e prejuízo funcional e personalizar o tratamento de pacientes com esquizofrenia (105).

**Figura 8.** Inter-relação dinâmica entre fatores genéticos, endofenotípicos e ambientais no desenvolvimento da SZ



Adaptado de Gottesman e Gould, 2003 (90)

## 2.5. MACHINE LEARNING

‘Machine learning’ é um método de análise de dados que automatiza a construção de modelos analíticos. É um ramo da inteligência artificial baseado na ideia de que sistemas computacionais podem aprender com dados, identificar padrões e tomar decisões com o mínimo de intervenção humana. Os avanços na tecnologia computacional aumentaram o poder de processamento dos computadores, permitindo análises de dados complexas. Algoritmos computacionais são largamente utilizados em grandes companhias de tecnologia na busca de melhorar o progresso das mesmas, sendo um deles as técnicas de machine learning. Grandes exemplos que podem ser citados são as companhias que envolvem redes sociais, como ‘facebook’, ‘instagram’, ‘google’, ‘apple’ e ‘whatsapp’. Tais empresas utilizam algoritmos complexos buscando aumentar número de vendas e expandir seus negócios, principalmente com modelos preditivos. Exemplos vão de uma simples indicação de um amigo em redes sociais para programações complexas de inteligência artificial em robôs (106). Outros exemplos do uso de machine learning estão listados na **tabela 5**.

**Tabela 5.** Exemplos de uso de machine learning

Identificação de mensagens de spam em e-mails	Predição de resultados de eleições
Programação de inteligência artificial, ex: ‘Siri’ do sistema operacional apple IOS	Desenvolvimento de algoritmos para drones, aviões e carros de auto-pilotagem
Previsão do tempo	Descobrimto de sequencias genéticas relacionadas com doenças
Diminuição de transações bancárias fraudulentas	Projeção de áreas com maior risco de criminalidade
Estimativas de danos em catástrofes naturais e tempestades	Otimização de energia em empresas e casas

Adaptado de Lantz, 2015 (106)

Comparado com métodos estatísticos tradicionais, que fornece resultados em relação aos grupos, algoritmos de machine learning permitem estratificações e predições de desfechos clínicos para cada indivíduo. Ademais, abordagens de machine learning permitem análises de ‘big data’, termo utilizado para denotar grandes e complexos volumes de dados, que têm importância ascendente dentro da prática clínica e sistemas

de saúde pública (107).

Baseado no amplo uso desta tecnologia, não é surpresa que alguns setores estão utilizando tais conhecimentos para focar em problemas de assistência à saúde. Várias áreas importantes da medicina utilizam abordagens de machine learning para melhorar a precisão de modelos preditivos, como em estadiamento e predição de sobrevida em cânceres e predição de desfechos em radioterapia e quimioterapia (108-110). Pesquisadores de saúde mental também vem utilizando tais técnicas para alcançar resultados mais consistentes. Algoritmos de machine learning estão sendo utilizados para avaliar características clínicas de transtorno depressivo maior (111) e para melhorar diagnóstico diferencial entre doenças psiquiátricas (112).

Um estudo realizado por Passos et al, 2016 (113), avaliou fatores clínicos de risco para tentativa de suicídio em pacientes com transtornos do humor. Foram incluídos na análise 17 variáveis possivelmente relacionadas com tentativas de suicídio, dentre elas: hospitalizações prévias, sintomas psicóticos prévios, dependência de cocaína, trabalho atual, etnia, transtorno de pânico, número de episódios depressivos prévios, dentre outros. Os resultados mostraram algoritmos capazes de reconhecer os indivíduos que tentaram suicídio com acurácia variando entre 65% a 72% e mostraram que hospitalizações prévias seriam um dos fatores mais importantes para tentativas futuras. Esta é uma área muito promissora que segue crescendo e que ainda tem que ser melhorada.

Em relação à investigação de mecanismos fisiopatológicos utilizando algoritmos de machine learning na esquizofrenia, modelos cada vez mais consistentes vêm sendo demonstrados. Tem-se publicações em revistas com importância global e altos fatores de impacto como JAMA Psychiatry (114) e Lancet Psychiatry (115) avaliando maturidade neuroanatômica e risco para SZ e desfechos de tratamento em indivíduos com primeiro episódio psicótico, respectivamente. Além disso, há outros estudos avaliando diferentes marcadores neuroanatômicos, predição de resposta ao tratamento e melhores modelos clínicos para diagnóstico diferencial (116-119), trazendo credibilidade para tais algoritmos.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A partir do explicitado acima, este estudo busca compreender como manifestações endofenotípicas da esquizofrenia podem influenciar nos desfechos tão limitantes que ocorrem na doença, utilizando métodos clássicos de análise estatística e métodos modernos de análise de dados, com propósito de influenciar positivamente na melhora de ações terapêuticas precoces que possam ter um impacto na evolução da doença.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a correlação de citocinas e desempenho cognitivo em esquizofrenia, seus irmãos não doentes e controles saudáveis e caracterizar envelhecimento acelerado patológico como um possível endofenótipo da doença.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.2.1. Investigar se os biomarcadores TNF- $\alpha$  e IL-6 estão relacionados com desempenho cognitivo em esquizofrenia, seus irmãos não afetados pela doença e em controles saudáveis

4.2.2. Caracterizar envelhecimento acelerado patológico como um possível endofenótipo de esquizofrenia utilizando técnicas de machine learning combinados com biomarcadores periféricos relacionados com o processo de envelhecimento.



## **5. MÉTODOS**

### **5.1. Participantes**

Participaram do estudo pacientes com esquizofrenia, irmãos de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia sem transtornos psiquiátricos e controles saudáveis, com idade entre 18 a 60 anos. Os critérios de inclusão para SZ foram estabilidade por pelo menos 6 meses antes da avaliação com a BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale) e diagnóstico confirmado com SCID (Structured Clinical Interview for DSM-IV). Para irmãos, os critérios foram: histórico negativo de doença psiquiátrica previa ou atual confirmado pelo SCID e ter um irmão com diagnóstico de esquizofrenia confirmado pelo SCID. Os controles saudáveis não tinham histórico de doença psiquiátrica atual ou prévia, nem histórico de doença mental em familiares de primeiro grau. Critérios de exclusão adicionais englobam: presença de doença neurológica, uso de substâncias psicoativas atual, tumor cerebral, doenças de tireoide e reumatológicas, doenças endócrinas e cardíacas não controladas, histórico de doenças autoimunes ou doenças inflamatórias crônicas, doenças sistêmicas graves, ter recebido terapia imunossupressora ou diagnóstico diferencial de demência ou deficiências intelectual.

### **5.2. Avaliação clínica e de performance de memória**

Todos os sujeitos foram submetidos a entrevista psiquiátrica para coleta de dados sócio demográficos e clínicos. Em seguida, psicólogos treinados aplicaram a Hopkins Verbal Learning Test-Revised (HVLT-R), um instrumento utilizado mundialmente para avaliação de aprendizado verbal e memória verbal episódica. A HVLT-R foi incluída na MATRICS Consensus Cognitive Battery (MCCB - National Institute of Mental Health's - Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia), uma reconhecida bateria de testes cognitivos com o objetivo de homogeneizar a avaliação cognitiva em esquizofrenia (120).

### **5.3. Análise de biomarcadores e aquisição de sangue**

Coletou-se 10ml de sangue venoso periférico de todos os participantes para as análises bioquímicas no Centro de Pesquisas Clínicas do HCPA. As amostras foram armazenadas no Freezer a -80C no Laboratório de Pesquisa Molecular do HCPA até o momento das análises. A análise de TNF-alpha e IL-6 foi feita utilizando-se kit altamente

sensível “sandwich-ELISA” para TNF-a e IL-6, conforme os procedimentos sugeridos pelos fabricantes (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). Todas as amostras foram avaliadas em duplicatas. A extração das eotaxinas CCL-11 e CCL-24 e dos marcadores de estresse oxidativo TBARS, PCC e GPx estão descritas com detalhes em publicações anteriores do grupo (95, 121). A medida de comprimento de telômero foi feita com sangue periférico que foi utilizado para extração de DNA genômico com o kit comercial (Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit, GE Healthcare) seguindo orientações dos fabricantes.

## **5.4. Análise de dados**

### **5.4.1. Análise estatística**

Para descrição da amostra foram utilizadas análises descritivas. As médias dos grupos foram comparadas utilizando testes paramétricos ou não paramétricos, quando necessário. As análises foram realizadas pelo software SPSS versão 22.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY: IBM Corp.).

### **5.4.2. Abordagem de machine learning**

Os modelos preditivos foram feitos utilizando o programa estatístico R, pacote “caret” (Versão 6.0-73) (122). Utilizamos o algoritmo de machine learning random forest, também chamado “decision tree forests”, um algoritmo que se baseia em métodos de formação de conjuntos. Ele integra a seleção aleatória das variáveis e adiciona diversidade ao modelo, melhorando a acurácia preditiva. Além disso, é um algoritmo não linear capaz de criar modelos com padrões mais complexos do que qualquer outro algoritmo (106).

A seleção de variáveis preditoras a serem utilizadas no treino do algoritmo são um desafio em machine learning. Entretanto, um método recomendado para escolhas das variáveis preditoras é o uso do “expert domain knowledge”, método reconhecido e utilizado em estudos prévios (123). Assim sendo, escolhemos tais preditores conforme os seguintes estudos: comprimento de telômero (76, 89); eotaxinas CCL-11 e CCL-24 (85, 121); e os marcadores de estresse oxidativo PCC, GPx e TBARS (95, 124).

Para se estabelecer a capacidade de generalização do algoritmo, utilizamos a abordagem “leave-one-out cross-validation” (LOOCV). Este processo implica em treinar o algoritmo com todos os sujeitos, exceto um. O processo se repete até que todos os sujeitos tenham sido usados pelo menos uma vez durante o algoritmo de treino. Esta abordagem garante que o modelo está sendo testado em dados “cegados”, a fim de evitar

resultados de acurácia superestimados. Este modelo se tornou padrão para estudos com tamanho de amostra pequenos (125).

A validade do algoritmo em prever a classificação dos sujeitos foi avaliada usando acurácia, área sob a curva ROC, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. O teste estatístico qui-quadrado comparando a classificação real sujeitos contra a classificação predita pelo algoritmo do random forest foi realizado e o nível de significância foi definido como  $p < 0.05$ . Estas análises foram feitas para os três grupos de comparação: esquizofrenia vs controle saudáveis; irmãos não afetados vs controles saudáveis; e esquizofrenia vs irmãos não afetados pela doença.

## **6. ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os participantes foram capazes de entender os instrumentos de pesquisa, e também de entender e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente à entrada no estudo. Também tinham a possibilidade de retirar o consentimento a qualquer momento. A identidade dos participantes foi mantida em sigilo durante todas as etapas do estudo e houve a garantia de que as informações coletadas seriam utilizadas exclusivamente com finalidades científicas. Os princípios bioéticos de autonomia, beneficência, não maleficência, veracidade e confidencialidade foram seguidos. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Artigo 1

Versão do manuscrito aceita:

#### **The relationship between cytokines and verbal memory in individuals with schizophrenia and their unaffected siblings**

Diego B Rebouças<sup>1,2</sup>, Francisco Diego Rabelo-da-Ponte<sup>1,2</sup>, Raffael Massuda<sup>1,3</sup>, Leticia S Czepielewski<sup>1,2</sup>, Clarissa S Gama<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Paraná - Curitiba, Brazil

#### **\* Corresponding Author:**

Clarissa S Gama

Hospital de Clínicas de Porto Alegre/CPE, Molecular Psychiatry Laboratory,

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Prédio Anexo, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 33598845; Fax: +55 51 33598846. E-mail: cgama@hcpa.edu.br

## **Abstract**

*Background:* Verbal memory impairment may be considered an endophenotype in schizophrenia, also affecting siblings of subjects with schizophrenia. Furthermore, the immune-inflammatory system response has an important modulatory effect on brain processes, especially on memory circuits. *Objective:* investigating the relationship between TNF- $\alpha$  and IL-6 and memory performance in patients with SZ, their unaffected siblings (SB) and healthy controls (HC). *Methods:* 35 subjects with SZ, 36 unaffected siblings of patients with SZ and 47 healthy controls underwent neurocognitive assessment for verbal memory with Hopkins Verbal Learning Test-Revised (HVLT-R) in addition to serum cytokines analyses. *Results:* SZ patients performed worse in HVLT-R than SB and HC, but SB and HC were not different. Regarding the biomarkers levels, we found significant results of TNF-  $\alpha$  for both groups. However, we did not find differences between groups after multiple comparisons analysis. There were no significant correlations between episodic verbal memory, TNF- $\alpha$  and IL-6. *Conclusion:* The results are compatible with the hypothesis that deficits in verbal memory of individuals with SZ could be secondary to inadequate functioning of cognitive processing areas, such as proactive cognitive control.

**Key words:** Schizophrenia; siblings; cognition; verbal memory; cytokines; biomarkers.

## Introduction

Schizophrenia (SZ) is a complex disease characterized by severe cognitive and psychosocial impairments [1]. Individuals with SZ exhibit deficits in a wide range of domains, from mild deficits to dementia-like syndromes [2]. Recently, efforts have been made to investigate cognitive abnormalities in unaffected siblings (SB) of SZ subjects, since SZ is a highly heritable disorder and so siblings may also have some cognitive traits of the disease [3].

One of the main neuropsychological impaired functions in subjects with SZ is episodic verbal memory (EVM) [4–6]. This cognitive impairment emerges during adolescence, indicating a potential neurodevelopmental cognitive marker [7]. Interestingly, EVM is an important predictor of daily-life functioning in SZ, including performance at work, social behavior, and the capacity for daily-life activities [8, 9]. Furthermore, first-degree relatives of individuals with SZ show deficits in all memory domains, especially verbal memory, compared to healthy controls (HC) [10–12].

EVM is more susceptible than other memory systems to neuronal dysfunction, having a higher risk of early deterioration. Additionally, it has extensive connectivity with the cortical and subcortical brain areas and overlaps with other memory systems [13]. Growing evidence indicates that inflammatory mechanisms may be an important feature underlying cognitive impairment [14, 15]. Specifically, cytokines like IL-6 and TNF- $\alpha$  may influence synaptic plasticity, neurogenesis, and memory processes [16–19].

Recent reports show that an inflammatory response is involved in SZ. A postmortem study observed that the brains of SZ patients exhibit high levels of the degradation products of fibrin which is involved in inflammatory processes [20, 21]. A meta-analysis found that patients with first-episode psychosis and relapsed patients show higher levels of proinflammatory cytokines than unaffected individuals [22]. Moreover,

there is considerable evidence of cytokines changes in SZ, but also imbalances involving broader areas of the immune-inflammatory system, such as the glial cells, autoantibodies, C-reactive protein (CRP), and kynurenine [23–25]. Similar changes have been observed in the siblings of patients with SZ, demonstrating that both affected and unaffected siblings have elevated concentrations of proteins associated with an inflammatory response [26].

Although the theoretical framework suggests that there may be biological abnormalities such as in cytokine imbalances behind memory impairments in SZ, it remains unclear whether there is an association between biomarker levels and memory impairment. This study was designed to investigate if the biomarkers TNF- $\alpha$  and IL-6 are related to memory performance in patients with SZ, in SB, and in HC.

## **Methods**

### *Participants*

The sample comprised 118 participants divided into 3 groups: individuals with SZ ( $n = 35$ ), SB ( $n = 36$ ), and HC ( $n = 47$ ). Experienced psychiatrists made the diagnosis of schizophrenia, confirmed by the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID). Inclusion criteria for outpatients with SZ were clinical stability for at least 6 months before the assessment by means of an 18-item Brief Psychiatry Rating Scale (BPRS), no current psychotic episode, and an age of between 18 and 60 years. For SB, inclusion criteria were: individuals without a current or previous history of psychiatric disease, confirmed by SCID, and an age of between 18 and 60 years. The HC had no current/past history, or a first-degree family history, of a major psychiatric disorder.

Additional exclusion criteria were a history or the presence of neurological disease, current abuse of drugs, a brain tumor, thyroid disease, rheumatological disease,



uncontrolled endocrine and cardiac disease, a history of autoimmune diseases or chronic infections/inflammatory diseases, severe systemic disease, or having received immunosuppressive therapy, or a diagnosis of intellectual disability or dementia.

All subjects were informed about the procedures and provided written informed consent. All procedures were approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil.

#### *Clinical and Memory Assessment*

All subjects underwent a psychiatric interview to collect sociodemographic and clinical data. Afterwards, experienced neuropsychologists administered the revised Hopkins Verbal Learning Test (HVLT-R), a word-list task widely used in psychiatric diseases that measures verbal learning and EVM [27].

#### *Blood Acquisition and Biomarker Analysis*

Each subject had a total volume of 10 mL of peripheral blood collected by venipuncture without anticoagulants and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the assay. Serum cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) were measured according to the procedures supplied by the manufacturer using highly sensitive sandwich-ELISA kits for TNF- $\alpha$  and IL-6 (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). All samples were assayed in duplicate.

#### *Data Analysis*

All statistical analysis was performed using SPSS v21.0. Descriptive data were expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range according to distribution. First, we analyzed data using the  $\chi^2$  and Kruskal-Wallis tests, and ANOVA according to Kolmogorov-Smirnov test for normality. Correction for multiple comparisons was used for significant results. Afterwards, we analyzed the relationship

between EVM performance and biomarkers by means of Spearman's correlations test.  $p < 0.05$  was considered significant. To control for possible confounders, we used general linear models with Pillai's trace test.

## Results

### *Participant's Characteristics*

The demographic and clinical variables are described in Table 1. Patients with SZ, SB, and HC did not differ in BMI and age. There were differences in years of education, gender, and number of cigarettes smoked per day.

### *EVM Performance and Cytokine Levels*

The SZ group had worse EVM performance in total immediate recall ( $F_{2, 114} = 24.86, p < 0.001$ ) and delayed recall ( $F_{2, 114} = 26.28, p < 0.001$ ) compared to HC and SB (Fig. 1).

HC and SB did not have different performances for HVLT-R total immediate recall scores ( $p = 0.528$ ) and HVLT-R delayed recall ( $p = 0.236$ ). We observed significant main effect for groups (Pillai's trace = 0.342,  $F_{4, 220} = 11.330, p < 0.001$ ), but not for sex (Pillai's trace = 0.024,  $F_{2, 109} = 1.348, p = 0.264$ ) and years of education (Pillai's trace = 0.058,  $F_{2, 109} = 3.383, p = 0.38$ ). Because of these negative results, no further analysis for possible confounds regarding cytokines were conducted.

Regarding the cytokines, there were group differences for TNF- $\alpha$  ( $F_{2, 114} = 6.319, p = 0.042$ ), but not for IL-6 ( $F_{2, 114} = 2.848, p = 0.241$ ) (Fig. 1). After multiple-comparisons adjustment for TNF- $\alpha$ , we did not find statistically significant results between the groups SZ versus HC ( $p = 1.00$ ), SZ versus SB ( $p = 0.063$ ), and HC versus SB ( $p = 0.125$ ).

### *Correlation between EVM and Cytokines*

We did not observe significant correlations between groups for short and long-term verbal memory and proinflammatory cytokines (full results can be seen in online suppl. Table 1; for all online suppl. material, see [www.karger.com/doi/10.1159/000492716](http://www.karger.com/doi/10.1159/000492716)).

### **Discussion**

This is the first neurocognitive study on relatives of patients with SZ that aimed to assess the association between EVM and proinflammatory cytokines. We did not find significant correlations between TNF- $\alpha$  or IL-6 and EVM for any of the groups. Recent research has demonstrated that inflammatory markers, including proinflammatory cytokines and chemokines, are associated with several pathophysiological functions, including a neuromodulatory effect on the central nervous system (CNS) [28]. Animal models suggest that the immune system is a vital component for modulating the CNS [29]. In such studies, specific cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ , are shown to modulate learning, memory, and synaptic plasticity [30]. Nevertheless, given the complexity of inflammatory signaling, conflicting results are still described in human subjects, making it difficult to understand the precise role of cytokines in the CNS [19].

Interestingly, a recent systematic review assessing cytokines and cognitive impairment in subjects with SZ and bipolar disorder (BD) claimed that most studies reported positive findings for TNF- $\alpha$  and cognitive performance, but that some did not find correlations between these 2 factors [25]. Seven studies tested the effects of IL-6 by means of neuropsychological tests on individuals with SZ or BD, but only 3 found a negative correlation between IL-6 and cognitive performance. In other words, the majority of the studies did not find a significant correlation between IL-6 and

neuropsychological performance. These inconsistent results may be due to methodological issues or because inflammatory processes are involved in only a subgroup of patients with SZ [31, 32].

Therefore, taking our results and the findings from the literature into consideration, the EVM observed in SZ subjects may not be due to a dysregulation of the neurobiological processes of memory. A hypothesis for our findings is that the deficits in memory performance of individuals with SZ would be secondary to higher-order cognitive deficits such as in the area of proactive cognitive control. This function is a form of cognitive processing that retains goal-relevant information to bias attention and maintain preparedness [33]. Proactive control dysfunction has been consistently documented in patients with schizophrenia and is associated with symptoms of disorganization [34, 35]. Thus, if there was an ineffective representation of information, the content of memory processes could be corrupted, and since episodic memory mechanisms rely on well-functioning memory processes, alterations in proactive control could lead to impairments in EVM.

Alterations in EVM have also been described in SB [36]. However, they showed a heterogeneous cognitive profile, ranging from deficits similar to those in SZ to cognitive performance analogous to HC [37]. Based on these different results, we included SB in this study to better evaluate the possible correlations between cytokines and cognitive impairment. We did not confirm correlations regarding TNF- $\alpha$ , IL-6, and HVLT, thus supporting that proactive dysregulation would lead to EVM impairment.

Our results may be explained by 2 factors: (1) patients were on antipsychotic medication, and (2) they were not in an acute episode (mean BPRS of 13). There is strong evidence of immune-inflammatory changes in SZ patients with acute exacerbations or a first psychotic episode [15, 22, 38]. It has been suggested that IL-1 $\beta$ , IL-2, and IL-6 could

be considered state markers, whereas TNF- $\alpha$ , IL-17, and IFN- $\gamma$  might be considered trait markers [39]. There is a trend towards TNF- $\alpha$  increase in SZ. One study showed lower levels of TNF- $\alpha$  in SZ subjects than in controls, demonstrating that we need to better understand the biological mechanisms in SZ to produce stronger evidence [40]. Therefore, chronic SZ patients on antipsychotics might show no cytokine differences when compared to HC or their respective SB [41].

Our results must be interpreted in the light of some limitations. First, we did not assess general intellectual functioning. We did not find a correlation between EVM and TNF- $\alpha$  or IL-6, but these cytokines may be correlated to other cognitive domains. Second, we did not measure other cytokines such as IL-1 $\beta$  and eotaxin [42, 43]. Furthermore, we did not analyze the potential influence of antipsychotics on cytokine levels. Other important factors that might influence biomarkers levels were the duration of pharmacological treatment and the psychotic state of patients (acute or chronic). In our sample, patients were in a chronic state. Finally, our sample was enrolled at a single outpatient psychiatric center, which may render the generalization of findings to other cultures and countries difficult.

Our results did not show correlations between TNF- $\alpha$ , IL-6, and HVLT-R in SZ patients, their SB, or HC. This result strengthens the hypothesis that EVM deficits in SZ might reflect a highly disorganized and inconsistent network. These deficits might be a consequence of primary cognitive control dysfunctions. Further studies are still necessary to better understand the pathophysiology and neuropsychology mechanisms in SZ. The increased knowledge in this field might provide a background for the development of enhanced psychological and psychiatric interventions aiming at cognitive improvement in individuals with this chronic debilitating disease [44].

---

## Acknowledgment

CNPq Universal 458294/2014-4.

### **Disclosure Statement**

There were no conflicts of interest.

### **Funding Sources**

No funding was received.

### **References**

1. Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the “right stuff”? *Schizophr Bull.* 2000;26(1):119–36.
2. Bora E, Binnur Akdede B, Alptekin K. Neurocognitive impairment in deficit and non-deficit schizophrenia: a meta-analysis. *Psychol Med.* 2017 Oct;47(14):2401–13.
3. Light G, Greenwood TA, Swerdlow NR, Calkins ME, Freedman R, Green MF, et al. Comparison of the heritability of schizophrenia and endophenotypes in the COGS-1 family study. *Schizophr Bull.* 2014 Nov;40(6):1404–11.
4. Green AE, Fitzgerald PB, Johnston PJ, Nathan PJ, Kulkarni J, Croft RJ. Evidence for a differential contribution of early perceptual and late cognitive processes during encoding to episodic memory impairment in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2017 Aug;18(5):369–81.
5. Bora E. Differences in cognitive impairment between schizophrenia and bipolar disorder: Considering the role of heterogeneity. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2016 Oct;70(10):424–33.
6. Krabbendam L, Arts B, van Os J, Aleman A. Cognitive functioning in patients with schizophrenia and bipolar disorder: a quantitative review. *Schizophr Res.* 2005 Dec;80(2–3):137–49.
7. Dickson H, Cullen AE, Jones R, Reichenberg A, Roberts RE, Hodgins S, et al.

- Trajectories of cognitive development during adolescence among youth at-risk for schizophrenia. *J Child Psychol Psychiatry*. 2018 Apr;
8. Kurtz MM, Wexler BE, Fujimoto M, Shagan DS, Seltzer JC. Symptoms versus neurocognition as predictors of change in life skills in schizophrenia after outpatient rehabilitation. *Schizophr Res*. 2008 Jul;102(1–3):303–11.
  9. Li AWY, Vinas-Guasch N, Hui CLM, Chang W-C, Chan SKW, Lee EHM, et al. Verbal working memory in schizophrenia: The role of syntax in facilitating serial recall. *Schizophr Res*. 2018 Feb;192:294–9.
  10. Aleman A, Hijman R, de Haan EH, Kahn RS. Memory impairment in schizophrenia: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*. 1999 Sep;156(9):1358–66.
  11. Whyte M-C, McIntosh AM, Johnstone EC, Lawrie SM. Declarative memory in unaffected adult relatives of patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res*. 2005 Oct;78(1):13–26.
  12. Fernandez VG, Asarnow R, Narr KL, Subotnik KL, Kuppinger H, Fogelson D, et al. Temporal lobe thickness and verbal memory in first-degree relatives of individuals with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2018 Feb;
  13. Tulving E. E PISODIC MEMORY : From Mind to Brain. *Annu Rev Psychol*. 2002;53:1–25.
  14. Di Benedetto S, Muller L, Wenger E, Duzel S, Pawelec G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Apr;75:114–28.
  15. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011 Oct;70(7):663–71.
  16. Levin SG, Godukhin O V. Modulating Effect of Cytokines on Mechanisms of Synaptic Plasticity in the Brain. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Mar;82(3):264–74.
  17. McAfoose J, Baune BT. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009 Mar;33(3):355–66.
  18. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun*. 2011 Feb;25(2):181–213.
  19. Donzis EJ, Tronson NC. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiol Learn Mem*. 2014 Nov;115:68–77.

20. Korschenhausen DA, Hampel HJ, Ackenheil M, Penning R, Muller N. Fibrin degradation products in post mortem brain tissue of schizophrenics: a possible marker for underlying inflammatory processes. *Schizophr Res.* 1996 May;19(2–3):103–9.
21. Muller N. Inflammation in Schizophrenia: Pathogenetic Aspects and Therapeutic Considerations. *Schizophr Bull.* 2018 Apr;
22. Goldsmith DR, Rapaport MH, Miller BJ. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Mol Psychiatry.* 2016 Dec;21(12):1696–709.
23. Erhardt S, Schwieler L, Imbeault S, Engberg G. The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology.* 2017 Jan;112(Pt B):297–306.
24. Watanabe Y, Someya T, Nawa H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2010 Jun;64(3):217–30.
25. Misiak B, Stanczykiewicz B, Kotowicz K, Rybakowski JK, Samochowiec J, Frydecka D. Cytokines and C-reactive protein alterations with respect to cognitive impairment in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review. *Schizophr Res.* 2018 Feb;192:16–29.
26. van Beveren NJM, Schwarz E, Noll R, Guest PC, Meijer C, de Haan L, et al. Evidence for disturbed insulin and growth hormone signaling as potential risk factors in the development of schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2014 Aug;4:e430.
27. Benedict RHB, Schretlen D, Groninger L, Brandt J. Hopkins Verbal Learning Test – Revised: Normative Data and Analysis of Inter-Form and Test-Retest Reliability. *Clin Neuropsychol [Internet].* 1998 Feb 1;12(1):43–55.
28. Vezzani A, Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology.* 2015 Sep;96(Pt A):70–82.
29. Chew L-J, Fusar-Poli P, Schmitz T. Oligodendroglial alterations and the role of microglia in white matter injury: relevance to schizophrenia. *Dev Neurosci.* 2013;35(2–3):102–29.
30. Camara M Lou, Corrigan F, Jaehne EJ, Jawahar MC, Ancomb H, Koerner H, et al. TNF-alpha and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2013 Dec;38(12):3102–14.



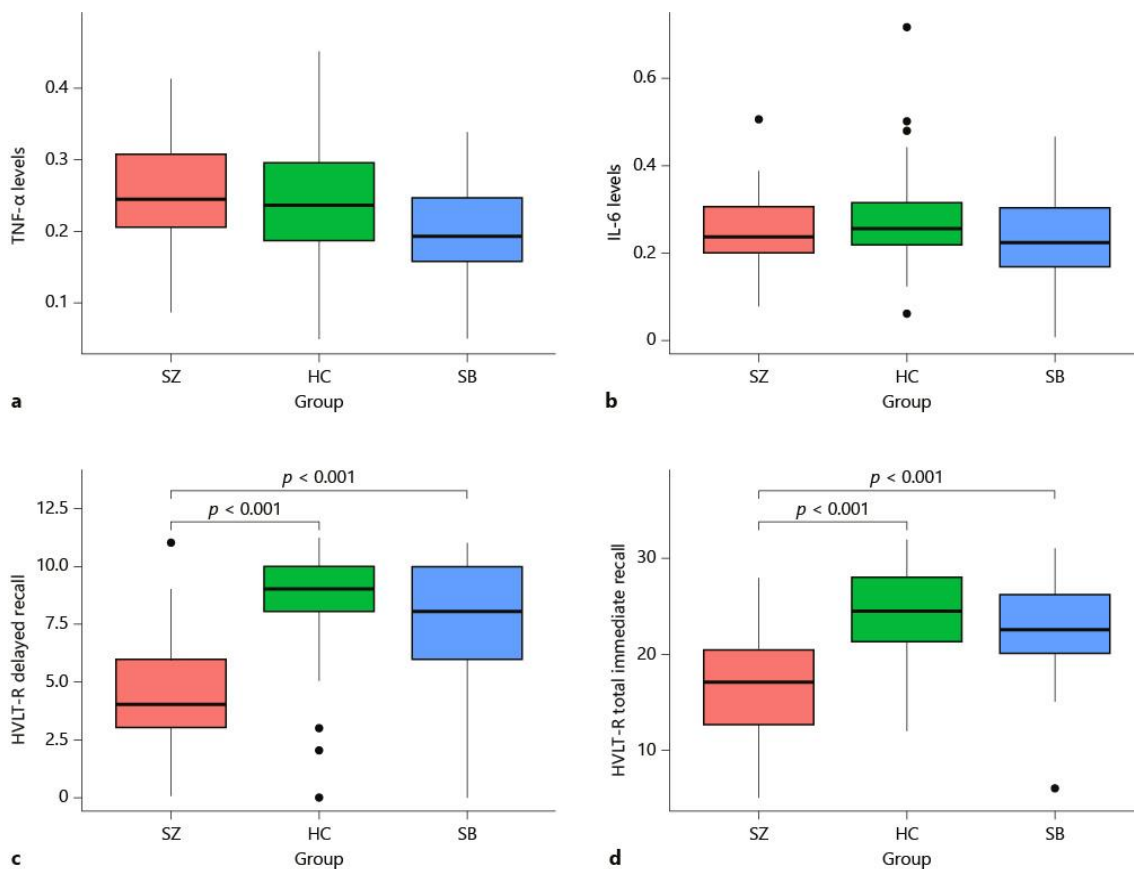
31. Muller N, Schwarz MJ. Immune System and Schizophrenia. *Curr Immunol Rev.* 2010 Aug;6(3):213–20.
32. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry.* 2008 Apr;63(8):801–8.
33. Barch DM, Ceaser A. Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms. *Trends Cogn Sci.* 2012 Jan;16(1):27–34.
34. Fassbender C, Scangos K, Lesh TA, Carter CS. RT distributional analysis of cognitive-control-related brain activity in first-episode schizophrenia. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 2014 Mar;14(1):175–88.
35. Lesh TA, Westphal AJ, Niendam TA, Yoon JH, Minzenberg MJ, Ragland JD, et al. Proactive and reactive cognitive control and dorsolateral prefrontal cortex dysfunction in first episode schizophrenia. *NeuroImage Clin.* 2013;2:590–9.
36. Massuda R, Bucker J, Czepielewski LS, Narvaez JC, Pedrini M, Santos BT, et al. Verbal memory impairment in healthy siblings of patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2013 Nov;150(2–3):580–2.
37. Quee PJ, Alizadeh BZ, Aleman A, van den Heuvel ER. Cognitive subtypes in non-affected siblings of schizophrenia patients: characteristics and profile congruency with affected family members. *Psychol Med.* 2014 Jan;44(2):395–405.
38. Hudson ZD, Miller BJ. Meta-Analysis of Cytokine and Chemokine Genes in Schizophrenia. *Clin Schizophr Relat Psychoses.* 2016 Jul;
39. Capuzzi E, Bartoli F, Crocamo C, Clerici M, Carra G. Acute variations of cytokine levels after antipsychotic treatment in drug-naive subjects with a first-episode psychosis: A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Jun;77:122–8.
40. Lv MH, Tan YL, Yan SX, Tian L, Chen DC, Tan SP, et al. Decreased serum TNF-alpha levels in chronic schizophrenia patients on long-term antipsychotics: correlation with psychopathology and cognition. *Psychopharmacology (Berl).* 2015 Jan;232(1):165–72.
41. Tourjman V, Kouassi E, Koue M-E, Rocchetti M, Fortin-Fournier S, Fusar-Poli P, et al. Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res.* 2013 Dec;151(1–3):43–7.
42. Czepielewski LS, Wang L, Gama CS, Barch DM. The Relationship of Intellectual Functioning and Cognitive Performance to Brain Structure in Schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2017 Mar;43(2):355–64.

43. Fillman SG, Weickert TW, Lenroot RK, Catts S V, Bruggemann JM, Catts VS, et al. Elevated peripheral cytokines characterize a subgroup of people with schizophrenia displaying poor verbal fluency and reduced Broca's area volume. *Mol Psychiatry*. 2016 Aug;21(8):1090–8.
44. Gaebel W, Zielasek J. Schizophrenia in 2020: Trends in diagnosis and therapy. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2015 Nov;69(11):661–73.

**Table 1.** Descriptive sociodemographic and clinical data of individuals with schizophrenia, healthy controls and siblings

Characteristic	SZ (n = 35)	Healthy Controls (n = 47)	Siblings (n = 36)	Statistical Analysis	Group comparisons, <i>p</i>		
					SZ × SB	SZ × HC	SB × HC
Gender							
Male/Female	24/11	21/26	15/21	$\chi^2=6.328$ , $df = 2$ , $p = 0.042^{**c}$			
Age, years <sup>b</sup>	40 (23)	41 (26)	40.5 (19)	$H(2) = 1.351$ , $p = 0.509^e$			
Years at school <sup>b</sup>	11 (5)	11 (5)	12 (5)	$H(2) = 8.952$ , $p = 0.011^{**e}$			
BMI <sup>a</sup>	26.09 (5.31)	25.96 (4.12)	25.39 (3.57)	$F(2,115) = 0.262$ , $p = 0.77^d$			
BPRS total scores <sup>b</sup>	13 (10)	–	–	–			
Smoker							
Y/N	15/20	8/39	5/31	$\chi^2=9.962$ , $df=2$ , $p = 0.007^{**c}$			
HVLT-R* delayed recall <sup>a</sup>	4.43 (2.46)	8.30 (2.45)	7.42 (2.42)	$F(2, 114) = 26.28$ , $p < 0.001^{**e}$	<0.001 <sup>**g</sup>	<0.001 <sup>**g</sup>	0.236 <sup>g</sup>
HVLT-R* total immediate recall <sup>a</sup>	16.43 (5.53)	24.04 (4.73)	22.83 (4.91)	$F(2, 114) = 24.86$ , $p < 0.001^{**e}$	<0.001 <sup>**g</sup>	<0.001 <sup>**g</sup>	0.528 <sup>g</sup>
TNF- $\alpha^b$	1.755 (0.455)	1.725 (0.455)	1.56 (0.3425)	$H(2, 114) = 6.319$ , $p = 0.042^{**e}$	0.063 <sup>¶</sup>	1.00 <sup>¶</sup>	0.125 <sup>¶</sup>
IL-6 <sup>b</sup>	1.72 (0.6075)	1.79 (0.445)	1.66 (0.5675)	$H(2, 114) = 2.848$ , $p = 0.241^e$			

SZ, schizophrenia; SB, unaffected siblings; HC, paired healthy controls; BMI, body mass index; BPRS, Brief Psychiatry Rating Scale; IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ . <sup>a</sup> Mean (standard deviation). <sup>b</sup> Median (interquartile range). <sup>c</sup> Chi-square. <sup>d</sup> ANOVA. <sup>e</sup> Kruskal-Wallis. <sup>g</sup> HVLT-R, Hopkins Verbal Learning Test-Revised. <sup>\*\*</sup> Statistical significance ( $p < 0.05$ ). <sup>¶</sup> Adjusted  $p$  value for multiple comparisons correction. <sup>g</sup> Tukey post hoc analysis.



**Fig. 1.** Episodic verbal memory performance and cytokine levels. SZ, schizophrenia; SB, unaffected siblings of schizophrenia patients; HC, healthy controls

## 7.2. Artigo 2

Versão do manuscrito submetida ao periódico Schizophrenia Research:

### **Accelerated aging signatures in individuals with schizophrenia and their unaffected siblings: a machine learning approach**

Authors: Diego Barreto Rebouças<sup>1,2</sup>, Juliana Mastella Sartori<sup>1,2</sup>, Diego Librenza-Garcia<sup>1,4</sup>, Raffael Massuda<sup>1,3</sup>, Leticia Sanguinetti Czepielewski<sup>1,2</sup>, Ives Cavalcante Passos<sup>1,2</sup>, Clarissa Severino Gama<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Paraná - Curitiba, Brazil

<sup>4</sup> Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University, Hamilton, ON, Canada.

#### **\* Corresponding Author:**

Clarissa S Gama

Hospital de Clínicas de Porto Alegre/CPE, Molecular Psychiatry Laboratory,

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Prédio Anexo, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 33598845; Fax: +55 51 33598846. E-mail: cgama@hcpa.edu.br

## **Abstract**

Schizophrenia (SZ) is a chronic debilitating disease. Subjects with the disorder have significant shorter life expectancy. Growing evidence suggests that a process of pathological accelerated aging occurs in SZ, leading to early development of severe clinical diseases and worse morbimortality. An interesting way of broadening the knowledge in this field is with endophenotypes studies including relatives of individuals with SZ. We aim to characterize accelerated aging as a possible endophenotype of schizophrenia by using a machine learning (ML) model of peripheral biomarkers to accurately differentiate subjects with SZ (n= 35), their unaffected siblings (SB, n= 36) and healthy controls (HC, n = 47). We used a random forest ML algorithm that included biomarkers related to aging: eotaxins CCL-11 and CCL-24; the oxidative stress markers thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), protein carbonyl content (PCC), and glutathione peroxidase (GPx); and telomere length (TL). The ML algorithm of biomarkers was able to distinguish individuals with SZ from HC with prediction accuracy of 79.7%, SZ from SB with 62.5% accuracy and SB from HC with 75.5% accuracy. These results support the hypothesis that a pathological accelerated aging occurs in SZ and that this pathological aging might be an endophenotype of the disease, once this profile was also observed in SB, suggesting that SB might suffer from an accelerated aging in some level.

**Key words:** Schizophrenia; siblings; machine learning; accelerated aging; biomarkers; endophenotypes.

## 1. Introduction

Schizophrenia is a chronic disease characterized by impaired neurodevelopment and additional neurodegeneration. Subjects with schizophrenia have 10-25 years shorter life expectancy, and the mortality rate is twice that of the general population (Crump et al., 2013). Although suicide is a major cause of mortality in subjects with schizophrenia, two-thirds of the remaining deaths are from other causes (Popovic et al., 2014). Furthermore, lifestyle and socioeconomic factors, such as poor health care, poor health habits and medication side effects, play a significant role in the unfavorable physical health outcomes and increased risk of serious medical illnesses (Wu et al., 2015). Interestingly, even with high-quality mental and physical health care, the mortality rates remain increased, suggesting that these factors may not explain the early mortality (Kochunov et al., 2013). Schizophrenia has been associated with an ongoing process of biological accelerated aging, which suggests a multifactorial model comprising physiological abnormalities, cognitive impairment and susceptibility to serious medical illnesses as the main characteristics to this hypothesis (Kirkpatrick et al., 2008). Although studies indicate that these processes could suggest a ‘pathological accelerated aging’, the neurobiological mechanisms and pathological underpinnings of schizophrenia are still unclear. New studies regarding this theory, therefore, are of paramount importance due to its significance in the progression of the disease and its possible relation to poor outcomes.

There is considerable evidence suggesting inflammatory alterations in SZ, involving not just cytokines, but also broader areas of the immune-inflammatory system, such as glial cells and autoantibodies (Watanabe et al., 2010; Miller et al., 2011; Erhardt et al., 2017). Moreover, elevated chronic inflammation status is strongly associated with aging, and increasing data indicates that it may be a driving factor in multiple age-related diseases (Franceschi et al., 2017). Recent findings investigated the potential role of biomarkers in aging in SZ subjects. A paper assessing the relationship of age, telomere length, eotaxin 1 (CCL-11), gray matter volume and episodic memory performance in schizophrenia found significant correlations between decreased TL, increased CCL-11, reduced gray matter volume and worse memory performance compared to healthy controls. Both biomarkers were related to reduced gray matter volume and worse verbal memory performance, therefore suggesting telomere length and CCL-11 as possible accelerated aging biological markers (Czepielewski et al., 2018).

Telomere length is a marker of cellular aging and has been associated with serious medical illnesses, including cardiovascular disease, diabetes and cancer, thus being related to premature mortality (Lindqvist et al., 2015). Meta-analysis overall results indicate that telomere length is decreased in schizophrenia, suggesting an accelerated aging profile (Polho et al., 2015).

Eotaxins, cytokines involved in attraction of cells to the inflammation site, have also been associated with neuroinflammatory unbalance and the process of aging (Hong et al., 2017). Animal studies demonstrated that increased peripheral CCL-11 was associated with decreased adult neurogenesis and impaired learning and memory (Villeda et al., 2011). These findings were supported by studies in schizophrenia subjects showing correlation between eotaxins and cognitive performance, mainly eotaxin-1 (CCL-11) and eotaxin-2 (CCL-24) (Asevedo et al., 2013). Additionally, a study evaluating these eotaxins in recent onset and chronic individuals with SZ showed elevated serum levels of CCL-24 in both recent onset and chronic SZ compared to HC and increased CCL-11 in chronic patients compared to HC (Pedrini et al., 2014).

Other important inflammatory markers that may have connection with accelerated aging are oxidative stress mediators. Oxidative stress substances have been indicated to play an important role in the pathophysiology of schizophrenia (Sertan Copoglu et al., 2015; Sawa and Sedlak, 2016). The oxidative stress theory of aging assumes that aging occurs as a result of damage to cell constituents and connective tissues by free radicals arising from oxygen-associated reactions (Okusaga, 2014). Oxidative stress telomere attrition is one of the main causes of telomere shortening (Rao et al., 2016), suggesting that the abnormalities in oxidative stress associated with schizophrenia could contribute to the biological process of accelerated aging. Well-known biomarkers of oxidative stress are thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), a secondary product of lipid peroxidation; protein carbonyl content (PCC), a result of structural peroxidative changes in proteins; and glutathione peroxidase (GPx), a defense enzyme mechanism against oxidative stress (Gubert et al., 2013; Dietrich-Muszalska and Kwiatkowska, 2014).

It is important to say that SZ is a disorder with high heritability, ranging from 41 to 87%, with a progressive familial risk that increases depending on the degree of genetic affinity with the patient. For instance, dizygotic twins share 50% of their genetic material, and if one twin has schizophrenia, the risk of the other having the illness is 10–15%. In contrast, monozygotic twins share 100% of their genetic material, increasing the risk for the disorder to 40-50% (Tandon et al., 2008; Chou et al., 2017). In light of this evidence,

since unaffected siblings of subjects with schizophrenia share heritable characteristics of patients, they could reveal possible not overt features of the disorder in some level. Similar biological and cognitive changes have been observed in SB in endophenotypic studies (Braff, 2015). Endophenotypes are identifiable components along the pathway between illness (phenotype) and genotype, allowing identification of some disorder features, being an important method to investigate genotypic manifestations in SZ (Gottesman and Gould, 2003).

Thus, considering that individuals with schizophrenia display alterations in peripheral biomarkers potentially related to aging and that this aging process is possibly associated with increasing somatic morbidity and mortality, we hypothesize that individuals with schizophrenia show an accelerated aging profile and that this process would be an endophenotype of the disease. Therefore, in order to characterize accelerated aging as potential endophenotype of schizophrenia, the aim of this study was to use machine learning techniques combined with peripheral biomarkers related to the aging process to accurately differentiate 1) patients with schizophrenia or unaffected siblings from healthy controls, 2) patients with schizophrenia from unaffected siblings.

## **2. Methods**

### **2.1. Participants**

A total of 118 subjects between 18 and 60 years old enrolled the study: 35 patients with schizophrenia, 36 unaffected siblings of subjects with schizophrenia and 47 unaffected individuals. The diagnosis of schizophrenia was confirmed by Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID). Patients were clinical stable for at least six months before assessment with 18-item Brief Psychiatry Rating Scale (BPRS). Unaffected siblings had no current or previous history of psychiatric disorder confirmed by SCID. Healthy controls had no current or past history, nor a first-degree family history, of a major psychiatric disorder. Additional exclusion criteria for participants were lifetime history of neurological disease, actual abuse of drugs, brain tumor, thyroid disease, rheumatological disease, uncontrolled endocrine and cardiac disease, history of autoimmune diseases or chronic infections/inflammatory diseases, severe systemic disease, or having received immunosuppressive therapy, or diagnosis of intellectual disability and dementia.

This study was approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), RS, Brazil. All participants were informed about the procedures and



provided written informed consent. Subsequently, subjects underwent a psychiatric evaluation to collect sociodemographic and clinical data.

## 2.2. Blood acquisition and biomarker analysis

Each subject had collected a total volume of 10 mL of peripheral blood by venipuncture without anticoagulants and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the assay. The measurement of relative telomere length was from whole peripheral venous blood that was used for genomic DNA extraction with a commercial kit (Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit, GE Healthcare) following manufacturers' instructions. The levels of biological markers CCL-11 and CCL-24 and TBARS, PCC and GPx were measured according to the procedures supplied by the manufacturer. The complete description of biochemical analysis is described in the Supplementary Methods.

## 2.3. Statistical Analysis

Analysis was performed using SPSS version 21.0. Demographic and clinical data were analyzed using chi-square test, Kruskal-Wallis test and ANOVA according to distribution and are indicated in Table 1. Descriptive characteristics are presented as mean and standard deviation or median and interquartile range, and p-values  $< 0.05$  were considered significant. The machine learning approach was performed in R.

## 2.4. Selection of predictor variables

The selection of predictor variables to be used in ‘training’ an algorithm is a challenge in machine learning (ML). However, a recommended method of selecting relevant predictor variables is the use of expert domain knowledge – largely known from previously published literature (Mwangi et al., 2014). Additionally, we limited the number of predictors to a ratio of 1 predictor per 10 observations, which is often suggested as a rule of thumb for regression to ensure adequate statistical power (Harrell et al., 1984). With these considerations in mind, based on our own published findings and those in the extant literature, we selected the following biomarkers to conduct the model: telomere length (Rao et al., 2016; Czepielewski et al., 2018); the eotaxins CCL-11 and CCL-24 (Asevedo et al., 2013; Pedrini et al., 2014; Teixeira et al., 2018); and the oxidative stress biomarkers PCC, GPx and TBARS (Gama et al., 2006; Massuda et al., 2013b). It is worth mentioning that all of them might be associated with accelerating aging.

## 2.5. Machine learning approach

We conducted the analyses after multiple imputations ( $m=5$ ,  $maxit=50$ ,  $seed=500$ ) with the R package *mice* (van Buuren and Groothuis-Oudshoorn, 2011). We had three missing datum in the TBARS and PCC variables, 7 in the GPx variable, 10 in the eotaxins CCL-11 and CCL-24 variables, and none for telomere variable. We also conducted sensitivity analysis without multiple imputations to estimate the effect of missing data on the results (see Figure S1 and Table S1 in Supplementary appendix). All predictive analyses were performed using the R package *caret* (Version 6.0-73) (Kuhn, 2008). We selected the *caret* package due to its automated tuning methods for machine learning algorithms (Kuhn, 2008). Random forest algorithm was used because 1) it is a non-linear algorithm and is capable of modeling more complex patterns than nearly any other algorithm; 2) it can handle categorical or continuous predictor variables (features); 3) it can be used to handle classification problems. Here, we briefly describe this machine learning algorithm, but detailed and technical discussions are given elsewhere (Lantz, 2015). Random forest (or decision tree forests) is an ensemble-based method that combines decision trees. It integrates the random selection of observations with the random selection of features to add additional diversity to the decision trees and thus improve prediction accuracy (Lantz, 2015). The tuning parameters to be selected were *mtry* (an integer specifying the number of features to randomly select at each split of a decision tree) for random forest. We selected the standard value as the *mtry*, which is the square root of the number of features (Lantz, 2015). Given the small number of observations, we choose to not perform hyperparameter tuning to avoid double dipping.

To establish the generalization ability of the algorithm, a leave-one-out cross-validation (LOOCV) approach was used. This process entailed training the algorithm with all subjects but one, a process which was repeated iteratively until all subjects were used during algorithm testing at-least once (Johnston et al., 2014). This approach ensures that our model is being tested in an “unseen” dataset in order to avoid overstating the accuracy of the model. LOOCV has become the standard for estimating model performance for studies with a small sample size.

The validity of the algorithm in predicting ‘novel’ subjects diagnostic labels was evaluated using prediction accuracy, area under the ROC curve, sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. A chi-square statistical test comparing subjects ‘actual’ labels against random forest predicted labels was performed, and significance was defined at  $p<0.05$ . These calculations were performed for all three comparisons: schizophrenia vs. healthy controls, unaffected siblings vs. healthy controls,

and schizophrenia vs. unaffected siblings.

### 3. Results

#### 3.1. Participant's characteristics

Patients with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls did not differ in age and BMI. There were differences in gender and number of cigarettes smoked per day. All demographic and clinical data are showed in Table 1.

#### 3.2. Biomarkers statistical analysis

As shown in Table 1, there were group differences in telomere length ( $H(2, 114) = 9.296, p = 0.010$ ); eotaxins CCL11 ( $H(2, 107) = 14.509, p = 0.001$ ) and CCL24 ( $H(2, 107) = 16.981, p < 0.001$ ); and GPx ( $H(2, 110) = 11.326, p = 0.003$ ). After multiple comparisons adjustment, we observed that SZ had significantly shorter telomere length than HC ( $p = 0.007$ ), however they were not different from SB ( $p = 0.277$ ). Regarding CCL11 and CCL24, individuals with SZ had higher levels than both HC ( $p < 0.005$ ) and SB ( $p < 0.005$ ). Subjects with SZ did not differ from HC in GPx levels ( $p = 1.00$ ), but SB had significantly higher levels when compared to SZ ( $p = 0.033$ ) and HC ( $p = 0.004$ ). Lastly, levels of PCC ( $H(2, 114) = 4.033, p = 0.133$ ) and TBARS ( $H(2, 114) = 0.435, p = 0.805$ ) were not different between groups.

#### 3.3. Machine learning algorithms

Random forest algorithm distinguished patients with schizophrenia from healthy controls with an accuracy of 79.7% ( $p < 0.05$ ) and AUC of 0.803, patients with schizophrenia from unaffected siblings with an accuracy of 62.5% ( $p < 0.05$ ) and AUC of 0.7266, and unaffected siblings from healthy controls with model accuracy of 75.5% ( $p < 0.05$ ) and AUC of 0.7506. Table 2 shows performance measurements for all comparisons.

The most relevant predictor variable in distinguishing the individuals with schizophrenia from healthy controls was CCL-24. Regarding the differentiation between unaffected siblings and both healthy controls and subjects with schizophrenia, the most relevant predictor variable was the oxidative biomarker GPx. Figure 1 presents confusion matrices, ROC curves and variable importance of the algorithms.

#### 4. Discussion

To our concern, this is the first study including unaffected relatives of patients with schizophrenia using an advanced machine learning approach to evaluate the feasibility of using peripheral biomarkers to develop an algorithm to differentiate independent separate groups for schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls. Our model was able to differentiate with good accuracy (79.7%) patients from healthy controls. These results are in accordance with findings in the literature suggesting biochemical pro-inflammatory and pro-oxidative unbalance in schizophrenia (Lin, 2015; Misiak et al., 2017). Intriguingly, the model had a better prediction accuracy for differentiating unaffected siblings and healthy controls (75.5%) than for unaffected siblings and schizophrenia (62.5%). These could be interpreted as the consequence of heritable features that are shared among patients and their siblings, which are different in healthy controls. Thus, our findings suggest that these biomarkers could be relevant endophenotypes of schizophrenia.

We have previously investigated possible endophenotypes of schizophrenia. Our group evaluated telomere length in SZ, their unaffected siblings and healthy controls and found shorter TL in SZ compared to HC and no difference for SB and both SZ and HC, suggesting that some degree of pathological telomere shortening might occur in SB (Czepielewski et al., 2016). Furthermore, higher levels of the oxidative stress marker protein carbonyl content was observed in SB compared to HC (Massuda et al., 2013b), implying that oxidative stress unbalance might also be present in SB. Additionally, neuroimaging and neuropsychological studies also display some abnormalities in siblings compared to healthy controls and individuals with schizophrenia, especially in brain connectivity and resting-state modes (Chang et al., 2014; Collin et al., 2014; Zalesky et al., 2015; Liu et al., 2016), and in verbal memory performance (Massuda et al., 2013a).

Interestingly, only four studies assessed unaffected siblings of subjects with schizophrenia using ML techniques (Guo et al., 2014a; Guo et al., 2014b; Guo et al., 2017; Pergola et al., 2017). These neuroimaging studies investigated neuroanatomical structures, functional connectivity and default mode network in the brain with magnetic resonance imaging, aiming to improve the detection of subjects at familiar risk for the disorder. Similarly to what was seen in our study, three manuscripts reported good accuracy (>70%) in differentiating siblings from unaffected individuals, through anatomical distance function (Guo et al., 2014a), thalamic gray matter volume (Pergola et al., 2017) and default mode network (Guo et al., 2014b). Guo (Guo et al., 2017)

assessed brain functional connectivity and found a high accuracy algorithm for distinguishing individuals with schizophrenia and healthy controls, however the results for siblings and healthy controls were not significant. Although there are no studies using ML techniques combined with blood biomarkers to evaluate possible endophenotypes, there is one study showing brain abnormalities associated with accelerated aging (Nenadic et al., 2017).

The aging process involves a complex construct with multiple pathophysiological mechanisms ranging from epigenetic changes and inflammation to metabolic changes and macromolecular damage. Although aging increases the risk of many chronic diseases, increasing evidence suggest that a number of diseases may also accelerate aspects of aging (Kennedy et al., 2014). Due to its importance, investigation of a pathological accelerated aging in mental health it is not restricted to SZ and some evidence has been described in bipolar disorder and major depression, suggesting there may be some common biological mechanisms across these diagnostic lines (Sacchet et al., 2017; Vasconcelos-Moreno et al., 2017). Regarding SZ and related disorders, findings combine brain abnormalities, including cognitive alterations, and abnormalities in the periphery such as increased inflammation and abnormal glucose tolerance (Kirkpatrick et al., 2008; Schnack et al., 2016; Cohen and Murante, 2018). Since elevated chronic sterile inflammation is strongly associated with aging, the inflammatory profile that occurs in SZ might be a driving factor in cell senescence (Kirkpatrick and Kennedy, 2018).

In our accelerated aging ML model, the most important variable in differentiating subjects with schizophrenia from healthy controls was CCL-24. The functions of CCL-24 are still not fully understood, and there is more consistent data associating CCL-11 to processes of aging than CCL-24. Although these eotaxins share similarities such as activation of Th2 response, regulation of neurogenesis, and modulation of neuroendocrine function, CCL-24 appears to display an important characteristic in differentiating schizophrenia from healthy controls, possibly related to accelerated aging profile (Stuart et al., 2015; Huber et al., 2018; Teixeira et al., 2018). Regarding the discrimination of SB from the SZ and HC group, the most important variable was GPx. This antioxidant enzyme incorporates the defensive system to oxidative stress providing a protective effect against cytosolic injury, which can lead to cell injury and death (Lubos et al., 2011). Functional variants of GPx are associated with increased risk of cardiovascular and peripheral vascular diseases in type II diabetes (Hamanishi et al., 2004), which are frequent outcomes in subjects with SZ and possibly associated with

accelerated aging. Therefore, the milder inflammatory profile that might occur in SB could lead to a compensatory activation of the antioxidant system in order to achieve homeostasis. Since it is suggested that subjects with SZ have dysfunctional antioxidant mechanisms, this might be a plausible explanation for the importance of GPx in the differentiation between SB and both SZ and HC (O'Donnell et al., 2014; Bai et al., 2018). These endophenotypic manifestations observed in relatives of SZ individuals highlight the potential vulnerability of SB in developing subsyndromal metabolic disturbances and eventually early severe clinical diseases such as diabetes, arterial hypertension, dyslipidemia and metabolic syndrome (Enez Darcin et al., 2015).

Our results must be interpreted in light of some limitations. The cross sectional design of the study restricts the conclusions that can be made from the results, making it difficult to separate the effects of age from other factors that may influence causal mechanisms. This is a common limitation of studies evaluating biomarker abnormalities in SZ (Nguyen et al., 2018), making it imperative to investigate them on a longitudinal design. Further, there are likely confounders associated with schizophrenia that could influence the analysis of aging and inflammatory biomarkers, such as medical and psychiatric comorbidities, lifestyle factors and medication effects, which were not addressed in this study. Nevertheless, all participants with schizophrenia were stable (median BPRS of 13).

Machine learning analysis is a growing research field in psychiatry that might provide predictive models that are able to assist in the diagnosis and treatment of patients, impacting clinical practice and public health systems (Passos et al., 2016; Passos and Mwangi, 2018). Regarding the pathophysiological investigation of schizophrenia, machine learning models are progressively more consistent (Chung et al., 2018). Important areas of study of this developing field are in constant ascendance, such as the improvement in classification stratification (Schnack, 2017; Madsen et al., 2018; Mothi et al., 2018), evaluation of neuroanatomical markers to differentiate neurodevelopmental trajectories (Rozycki et al., 2017), and prediction in treatment response (Koutsouleris et al., 2016; Koutsouleris et al., 2017). Therefore, these results bring relevant evidence to this emerging field. Nevertheless, despite the promise involving the application of ML models, this approach requires discipline to generate valid constructs to enlarge the understanding of the biological mechanisms of schizophrenia. It is important to build hypothesis driven research that fits into a biological theory, avoiding multiple unused data (Tandon and Tandon, 2018).

In conclusion, the present study was able to differentiate unaffected siblings from

healthy controls using peripheral biomarkers with a random forest machine learning algorithm reaching good accuracy, strengthening the hypothesis of accelerated aging as an endophenotype of schizophrenia. Furthermore, our results suggest that mild manifestations of pathological accelerated aging might occur in siblings of patients, possibly increasing the susceptibility to early cognitive decline and serious medical illnesses. The enhanced understanding of this field could provide relevant biomarkers to help the development of early interventions in order to reduce possible future deficits.

### **Data Availability Statement**

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

### **Role of funding sources**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance code 001 and CNPq Universal 458294/2014-4. This work was also supported by the FIPE/HCPA (10-0348) and FAPERGS.

### **Contributors**

CSG, DBR, RM and ICP designed the study; DBR, JMS, RM and LSC collected the data; DBR, LSC, JMS, DLG, ICP and CSG performed the analyses and interpreted the results; DBR, LSC, ICP and CSG wrote the manuscript.

### **Conflict of interest**

No conflict of interest.

### **Acknowledgment**

Leticia Czepielewski thanks CNPq PDJ 153081/2018-0 and Clarissa Gama thanks CNPq PQ 304443/2014-0.

### **References**

Asevedo, E., Gadelha, A., Noto, C., Mansur, R.B., Zugman, A., Belangero, S.I., Berberian, A.A., Scarpato, B.S., Leclerc, E., Teixeira, A.L., Gama, C.S., Bressan, R.A., Brietzke, E., 2013. Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *Journal of psychiatric research* 47(10), 1376-1382.

- Bai, Z.L., Li, X.S., Chen, G.Y., Du, Y., Wei, Z.X., Chen, X., Zheng, G.E., Deng, W., Cheng, Y., 2018. Serum Oxidative Stress Marker Levels in Unmedicated and Medicated Patients with Schizophrenia.
- Braff, D.L., 2015. The importance of endophenotypes in schizophrenia research. *Schizophrenia research* 163(1-3), 1-8.
- Chang, X., Shen, H., Wang, L., Liu, Z., Xin, W., Hu, D., Miao, D., 2014. Altered default mode and fronto-parietal network subsystems in patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Brain research* 1562, 87-99.
- Chou, I.J., Kuo, C.F., Huang, Y.S., Grainge, M.J., Valdes, A.M., See, L.C., Yu, K.H., Luo, S.F., Huang, L.S., Tseng, W.Y., Zhang, W., Doherty, M., 2017. Familial Aggregation and Heritability of Schizophrenia and Co-aggregation of Psychiatric Illnesses in Affected Families. *Schizophrenia bulletin* 43(5), 1070-1078.
- Chung, Y., Addington, J., Bearden, C.E., Cadenhead, K., Cornblatt, B., Mathalon, D.H., McGlashan, T., Perkins, D., Seidman, L.J., Tsuang, M., Walker, E., Woods, S.W., McEwen, S., van Erp, T.G.M., Cannon, T.D., 2018. Use of Machine Learning to Determine Deviance in Neuroanatomical Maturity Associated With Future Psychosis in Youths at Clinically High Risk. *JAMA psychiatry*.
- Cohen, C.I., Murante, T., 2018. A prospective analysis of the role of cognition in three models of aging and schizophrenia. *Schizophrenia research* 196, 22-28.
- Collin, G., Kahn, R.S., de Reus, M.A., Cahn, W., van den Heuvel, M.P., 2014. Impaired rich club connectivity in unaffected siblings of schizophrenia patients. *Schizophrenia bulletin* 40(2), 438-448.
- Crump, C., Winkleby, M.A., Sundquist, K., Sundquist, J., 2013. Comorbidities and mortality in persons with schizophrenia: a Swedish national cohort study. *The American journal of psychiatry* 170(3), 324-333.
- Czepielewski, L.S., Massuda, R., Panizzutti, B., da Rosa, E.D., de Lucena, D., Macedo, D., Grun, L.K., Barbe-Tuana, F.M., Gama, C.S., 2016. Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging. *Schizophrenia research* 174(1-3), 39-42.
- Czepielewski, L.S., Massuda, R., Panizzutti, B., Grun, L.K., Barbe-Tuana, F.M., Teixeira, A.L., Barch, D.M., Gama, C.S., 2018. Telomere Length and CCL11 Levels are Associated With Gray Matter Volume and Episodic Memory Performance in Schizophrenia: Evidence of Pathological Accelerated Aging. *Schizophrenia bulletin*.
- Dietrich-Muszalska, A., Kwiatkowska, A., 2014. Generation of superoxide anion radicals and platelet glutathione peroxidase activity in patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric disease and treatment* 10, 703-709.
- Enez Darcin, A., Yalcin Cavus, S., Dilbaz, N., Kaya, H., Dogan, E., 2015. Metabolic syndrome in drug-naive and drug-free patients with schizophrenia and in their siblings. *Schizophrenia research* 166(1-3), 201-206.
- Erhardt, S., Schwieler, L., Imbeault, S., Engberg, G., 2017. The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology* 112(Pt B), 297-306.
- Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., Salvioli, S., 2017. Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28(3), 199-212.



Gama, C.S., Salvador, M., Andreazza, A.C., Kapczinski, F., Silva Belmonte-de-Abreu, P., 2006. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 30(3), 512-515.

Gottesman, I.I., Gould, T.D., 2003. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American journal of psychiatry* 160(4), 636-645.

Gubert, C., Stertz, L., Pfaffenseller, B., Panizzutti, B.S., Rezin, G.T., Massuda, R., Streck, E.L., Gama, C.S., Kapczinski, F., Kunz, M., 2013. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *Journal of psychiatric research* 47(10), 1396-1402.

Guo, S., Palaniyappan, L., Yang, B., Liu, Z., Xue, Z., Feng, J., 2014a. Anatomical distance affects functional connectivity in patients with schizophrenia and their siblings. *Schizophrenia bulletin* 40(2), 449-459.

Guo, W., Liu, F., Chen, J., Wu, R., Li, L., Zhang, Z., Chen, H., Zhao, J., 2017. Using short-range and long-range functional connectivity to identify schizophrenia with a family-based case-control design. *Psychiatry research. Neuroimaging* 264, 60-67.

Guo, W., Su, Q., Yao, D., Jiang, J., Zhang, J., Zhang, Z., Yu, L., Zhai, J., Xiao, C., 2014b. Decreased regional activity of default-mode network in unaffected siblings of schizophrenia patients at rest. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 24(4), 545-552.

Hamanishi, T., Furuta, H., Kato, H., Doi, A., Tamai, M., Shimomura, H., Sakagashira, S., Nishi, M., Sasaki, H., Sanke, T., Nanjo, K., 2004. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53(9), 2455-2460.

Harrell, F.E., Jr., Lee, K.L., Califf, R.M., Pryor, D.B., Rosati, R.A., 1984. Regression modelling strategies for improved prognostic prediction. *Statistics in medicine* 3(2), 143-152.

Hong, S., Lee, E.E., Martin, A.S., Soontornniyomkij, B., Soontornniyomkij, V., Achim, C.L., Reuter, C., Irwin, M.R., Eyster, L.T., Jeste, D.V., 2017. Abnormalities in chemokine levels in schizophrenia and their clinical correlates. *Schizophrenia research* 181, 63-69.

Huber, A.K., Giles, D.A., Segal, B.M., Irani, D.N., 2018. An emerging role for eotaxins in neurodegenerative disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 189, 29-33.

Johnston, B.A., Mwangi, B., Matthews, K., Coghill, D., Konrad, K., Steele, J.D., 2014. Brainstem abnormalities in attention deficit hyperactivity disorder support high accuracy individual diagnostic classification. *Human brain mapping* 35(10), 5179-5189.

Kennedy, B.K., Berger, S.L., Brunet, A., Campisi, J., Cuervo, A.M., Epel, E.S., Franceschi, C., Lithgow, G.J., Morimoto, R.I., Pessin, J.E., Rando, T.A., Richardson, A., Schadt, E.E., Wyss-Coray, T., Sierra, F., 2014. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell* 159(4), 709-713.

Kirkpatrick, B., Kennedy, B.K., 2018. Accelerated aging in schizophrenia and related disorders: Future research. *Schizophrenia research* 196, 4-8.

- Kirkpatrick, B., Messias, E., Harvey, P.D., Fernandez-Egea, E., Bowie, C.R., 2008. Is schizophrenia a syndrome of accelerated aging? *Schizophrenia bulletin* 34(6), 1024-1032.
- Kochunov, P., Glahn, D.C., Rowland, L.M., Olvera, R.L., Winkler, A., Yang, Y.H., Sampath, H., Carpenter, W.T., Duggirala, R., Curran, J., Blangero, J., Hong, L.E., 2013. Testing the hypothesis of accelerated cerebral white matter aging in schizophrenia and major depression. *Biological psychiatry* 73(5), 482-491.
- Koutsouleris, N., Kahn, R.S., Chekroud, A.M., Leucht, S., Falkai, P., Wobrock, T., Derks, E.M., Fleischhacker, W.W., Hasan, A., 2016. Multisite prediction of 4-week and 52-week treatment outcomes in patients with first-episode psychosis: a machine learning approach. *The lancet. Psychiatry* 3(10), 935-946.
- Koutsouleris, N., Wobrock, T., Guse, B., Langguth, B., Landgrebe, M., Eichhammer, P., Frank, E., Cordes, J., Wolwer, W., Musso, F., Winterer, G., Gaebel, W., Hajak, G., Ohmann, C., Verde, P.E., Rietschel, M., Ahmed, R., Honer, W.G., Dwyer, D., Ghaseminejad, F., Dechent, P., Malchow, B., Kreuzer, P.M., Poepl, T.B., Schneider-Axmann, T., Falkai, P., Hasan, A., 2017. Predicting Response to Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Patients With Schizophrenia Using Structural Magnetic Resonance Imaging: A Multisite Machine Learning Analysis. *Schizophrenia bulletin*.
- Kuhn, M., 2008. Building Predictive Models in R Using the caret Package. 2008 28(5), 26.
- Lantz, B., 2015. Machine Learning with R. 2nd ed. Packt Publishing.
- Lin, P.Y., 2015. Shortened leukocyte telomere length in patients with schizophrenia is related to disease status. *Schizophrenia research* 168(1-2), 597-598.
- Lindqvist, D., Epel, E.S., Mellon, S.H., Penninx, B.W., Revesz, D., Verhoeven, J.E., Reus, V.I., Lin, J., Mahan, L., Hough, C.M., Rosser, R., Bersani, F.S., Blackburn, E.H., Wolkowitz, O.M., 2015. Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 55, 333-364.
- Liu, C., Xue, Z., Palaniyappan, L., Zhou, L., Liu, H., Qi, C., Wu, G., Mwansisya, T.E., Tao, H., Chen, X., Huang, X., Liu, Z., Pu, W., 2016. Abnormally increased and incoherent resting-state activity is shared between patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Schizophrenia research* 171(1-3), 158-165.
- Lubos, E., Loscalzo, J., Handy, D.E., 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling* 15(7), 1957-1997.
- Madsen, K.H., Krohne, L.G., Cai, X.L., Wang, Y., Chan, R.C.K., 2018. Perspectives on Machine Learning for Classification of Schizotypy Using fMRI Data. *Schizophrenia bulletin*.
- Massuda, R., Bucker, J., Czepielewski, L.S., Narvaez, J.C., Pedrini, M., Santos, B.T., Teixeira, A.S., Souza, A.L., Vasconcelos-Moreno, M.P., Vianna-Sulzbach, M., Goi, P.D., Belmonte-de-Abreu, P., Gama, C.S., 2013a. Verbal memory impairment in healthy siblings of patients with schizophrenia. *Schizophrenia research* 150(2-3), 580-582.

- Massuda, R., Pedrini, M., Reckziegel, R., Costanzi, M., Ferrari, P., Gubert, C., Gama, C.S., 2013b. Elevated serum protein oxidative stress in siblings of patients with schizophrenia. *Schizophrenia research* 147(2-3), 398-399.
- Miller, B.J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A., Kirkpatrick, B., 2011. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological psychiatry* 70(7), 663-671.
- Misiak, B., Stanczykiewicz, B., Kotowicz, K., Rybakowski, J.K., Samochowiec, J., Frydecka, D., 2017. Cytokines and C-reactive protein alterations with respect to cognitive impairment in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review. *Schizophrenia research*.
- Mothi, S.S., Sudarshan, M., Tandon, N., Tamminga, C., Pearlson, G., Sweeney, J., Clementz, B., Keshavan, M.S., 2018. Machine learning improved classification of psychoses using clinical and biological stratification: Update from the bipolar-schizophrenia network for intermediate phenotypes (B-SNIP). *Schizophrenia research*.
- Mwangi, B., Tian, T.S., Soares, J.C., 2014. A review of feature reduction techniques in neuroimaging. *Neuroinformatics* 12(2), 229-244.
- Nenadic, I., Dietzek, M., Langbein, K., Sauer, H., Gaser, C., 2017. BrainAGE score indicates accelerated brain aging in schizophrenia, but not bipolar disorder. *Psychiatry research. Neuroimaging* 266, 86-89.
- Nguyen, T.T., Eyler, L.T., Jeste, D.V., 2018. Systemic Biomarkers of Accelerated Aging in Schizophrenia: A Critical Review and Future Directions. *Schizophrenia bulletin* 44(2), 398-408.
- O'Donnell, P., Do, K.Q., Arango, C., 2014. Oxidative/Nitrosative stress in psychiatric disorders: are we there yet? *Schizophrenia bulletin* 40(5), 960-962.
- Okusaga, O.O., 2014. Accelerated aging in schizophrenia patients: the potential role of oxidative stress. *Aging and disease* 5(4), 256-262.
- Passos, I.C., Mwangi, B., 2018. Machine learning-guided intervention trials to predict treatment response at an individual patient level: an important second step following randomized clinical trials. *Molecular psychiatry*.
- Passos, I.C., Mwangi, B., Kapczinski, F., 2016. Big data analytics and machine learning: 2015 and beyond. *The lancet. Psychiatry* 3(1), 13-15.
- Pedrini, M., Massuda, R., de Lucena, D., Macedo, D., Paz, A.V., Lobato, M.I., Belmonte-de-Abreu, P.S., Cereser, K.M., Rocha, N.P., Curra, M.D., Panizzutti, B.S., Teixeira, A.L., Gama, C.S., 2014. Differences in eotaxin serum levels patients with recent onset and in chronic stable schizophrenia: a clue for understanding accelerating aging profile. *Schizophrenia research* 152(2-3), 528-529.
- Pergola, G., Trizio, S., Di Carlo, P., Taurisano, P., Mancini, M., Amoroso, N., Nettis, M.A., Andriola, I., Caforio, G., Papolizio, T., Rampino, A., Di Giorgio, A., Bertolino, A., Blasi, G., 2017. Grey matter volume patterns in thalamic nuclei are associated with familial risk for schizophrenia. *Schizophrenia research* 180, 13-20.
- Polho, G.B., De-Paula, V.J., Cardillo, G., dos Santos, B., Kerr, D.S., 2015. Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophrenia research* 165(2-3), 195-200.

- Popovic, D., Benabarre, A., Crespo, J.M., Goikolea, J.M., Gonzalez-Pinto, A., Gutierrez-Rojas, L., Montes, J.M., Vieta, E., 2014. Risk factors for suicide in schizophrenia: systematic review and clinical recommendations. *Acta psychiatrica Scandinavica* 130(6), 418-426.
- Rao, S., Kota, L.N., Li, Z., Yao, Y., Tang, J., Mao, C., Jain, S., Xu, Y., Xu, Q., 2016. Accelerated leukocyte telomere erosion in schizophrenia: Evidence from the present study and a meta-analysis. *Journal of psychiatric research* 79, 50-56.
- Rozycki, M., Satterthwaite, T.D., Koutsouleris, N., Erus, G., Doshi, J., Wolf, D.H., Fan, Y., Gur, R.E., Gur, R.C., Meisenzahl, E.M., Zhuo, C., Ying, H., Yan, H., Yue, W., Zhang, D., Davatzikos, C., 2017. Multisite Machine Learning Analysis Provides a Robust Structural Imaging Signature of Schizophrenia Detectable Across Diverse Patient Populations and Within Individuals. *Schizophrenia bulletin*.
- Sacchet, M.D., Camacho, M.C., Livermore, E.E., Thomas, E.A.C., Gotlib, I.H., 2017. Accelerated aging of the putamen in patients with major depressive disorder. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* 42(3), 164-171.
- Sawa, A., Sedlak, T.W., 2016. Oxidative stress and inflammation in schizophrenia. *Schizophrenia research* 176(1), 1-2.
- Schnack, H.G., 2017. Improving individual predictions: Machine learning approaches for detecting and attacking heterogeneity in schizophrenia (and other psychiatric diseases). *Schizophrenia research*.
- Schnack, H.G., van Haren, N.E., Nieuwenhuis, M., Hulshoff Pol, H.E., Cahn, W., Kahn, R.S., 2016. Accelerated Brain Aging in Schizophrenia: A Longitudinal Pattern Recognition Study. *The American journal of psychiatry* 173(6), 607-616.
- Sertan Copoglu, U., Virit, O., Hanifi Kokacya, M., Orkmez, M., Bulbul, F., Binnur Erbagci, A., Semiz, M., Alpak, G., Unal, A., Ari, M., Savas, H.A., 2015. Increased oxidative stress and oxidative DNA damage in non-remission schizophrenia patients. *Psychiatry research* 229(1-2), 200-205.
- Stuart, M.J., Singhal, G., Baune, B.T., 2015. Systematic Review of the Neurobiological Relevance of Chemokines to Psychiatric Disorders. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 357.
- Tandon, N., Tandon, R., 2018. Will Machine Learning Enable Us to Finally Cut the Gordian Knot of Schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 44(5), 939-941.
- Tandon, R., Keshavan, M.S., Nasrallah, H.A., 2008. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophrenia research* 102(1-3), 1-18.
- Teixeira, A.L., Gama, C.S., Rocha, N.P., Teixeira, M.M., 2018. Revisiting the Role of Eotaxin-1/CCL11 in Psychiatric Disorders. *Frontiers in psychiatry* 9, 241.
- van Buuren, S., Groothuis-Oudshoorn, K., 2011. mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. 2011 45(3), 67.
- Vasconcelos-Moreno, M.P., Fries, G.R., Gubert, C., Dos Santos, B., Fijtman, A., Sartori, J., Ferrari, P., Grun, L.K., Parisi, M.M., Guma, F., Barbe-Tuana, F.M., Kapczinski, F., Rosa, A.R., Yatham, L.N., Kauer-Sant'Anna, M., 2017. Telomere Length, Oxidative Stress, Inflammation and BDNF Levels in Siblings of Patients with

Bipolar Disorder: Implications for Accelerated Cellular Aging. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 20(6), 445-454.

Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K.M., Czirr, E., Park, J.S., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E.R., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Galasko, D.R., Xie, X.S., Rando, T.A., Wyss-Coray, T., 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477(7362), 90-94.

Watanabe, Y., Someya, T., Nawa, H., 2010. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry and clinical neurosciences* 64(3), 217-230.

Wu, C.S., Lai, M.S., Gau, S.S., 2015. Complications and mortality in patients with schizophrenia and diabetes: population-based cohort study. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 207(5), 450-457.

Zalesky, A., Pantelis, C., Croyley, V., Fornito, A., Cocchi, L., McAdams, H., Clasen, L., Greenstein, D., Rapoport, J.L., Gogtay, N., 2015. Delayed Development of Brain Connectivity in Adolescents With Schizophrenia and Their Unaffected Siblings. *JAMA psychiatry* 72(9), 900-908.

**Table 1.** Descriptive sociodemographic and clinical data for schizophrenia, unaffected siblings and healthy controls.

Characteristic	Individuals with schizophrenia (n = 35)	Healthy Controls (n = 47)	Siblings of individuals with schizophrenia (n = 36)	Statistical Analysis	Group comparisons, p		
					SZ x SB	SZ x HC	SB x HC
<b>Gender (Male/ Female)</b>	24/11	21/26	15/21	$\chi^2=6.328, df=2, p=0.042^* \text{ c}$	0.023 <sup>c</sup>	0.032 <sup>c</sup>	0.784 <sup>c</sup>
<b>Age (years)<sup>a</sup></b>	36.60 (12.38)	40 (13.65)	38.78 (11.88)	$F(2,115) = 0.717, p=0.491 \text{ d}$			
<b>BMI<sup>a</sup></b>	26.09 (5.31)	25.96 (4.12)	25.39 (3.57)	$F(2,115) = 0.262, p=0.77 \text{ d}$			
<b>Smoker (Y/N)<sup>a</sup></b>	15/20	8/39	5/31	$\chi^2=9.962, df=2, p=0.007^* \text{ c}$	0.007 <sup>c</sup>	0.010 <sup>c</sup>	0.697 <sup>c</sup>
<b>Years of disease<sup>a</sup></b>	15.10 (11.27)	-	-	-			
<b>BPRS total scores<sup>a</sup></b>	14.49 (7.17)	-	-	-			
<b>Medication (%)</b>							
<b>Typical antipsychotics</b>	22,9%	-	-	-			
<b>Atypical antipsychotics</b>	22,9%	-	-	-			
<b>Clozapine</b>	54,3%	-	-	-			
<b>Chlorpromazine equivalence<sup>a</sup></b>	593.76 (254.33)						
<b>Telomere length<sup>b</sup></b>	0.8697 (0.4361)	1.1564 (1.2070)	0.9767 (0.9096)	$H(2, 114)= 9.296, p=0.010^{*e}$	0.277 <sup>g</sup>	0.007 <sup>*g</sup>	0.613 <sup>g</sup>
<b>CCL11<sup>b</sup></b>	1021.59 (1196.56)	671.48 (862.01)	543.38 (1026.26)	$H(2, 107)= 14.509, p=0.001^{*e}$	0.001 <sup>*g</sup>	0.011 <sup>*g</sup>	0.772 <sup>g</sup>
<b>CCL24<sup>b</sup></b>	5507.95 (5125.63)	2903.90 (2938.02)	2448.37 (3462.83)	$H(2, 107)=16.981, p<0.001^{*e}$	0.003 <sup>*g</sup>	<0.001 <sup>*g</sup>	1.000 <sup>g</sup>
<b>GPx<sup>b</sup></b>	6068.60 (15303.43)	3166.22 (15303.43)	10422.16 (15171.50)	$H(2, 110)=11.326, p=0.003^{*e}$	0.033 <sup>*g</sup>	1.00 <sup>g</sup>	0.004 <sup>*g</sup>
<b>TBARS<sup>b</sup></b>	12.1667 (14.170)	13.000 (17.50)	13.416 (14.170)	$H(2, 114)= 0.435, p=0.805 \text{ e}$			
<b>PCC<sup>b</sup></b>	0.2012 (0.0180)	0.2039 (0.0093)	0.0229 (0.0291)	$H(2, 114)= 4.033, p=0.133 \text{ e}$			

Note: SZ: schizophrenia; SB: unaffected siblings; HC: paired healthy controls; BMI: body mass index; BPRS: Brief Psychiatry Rating Scale; CCL11: C-C-motif chemokine 11 (eotaxin-1); CCL24: C-C-motif chemokine 24 (eotaxin -2); GPx: glutathione peroxidase; TBARS: Thiobarbituric acid-reactive substances; PCC: protein carbonyl content

a. Mean (standard deviation).

b. Median (interquartile range).

c. Chi-square.

d. ANOVA.

e. Kruskal-Wallis.

\* Statistical significance ( $p < 0.05$ )

g. Adjusted p value for multiple comparisons correction

**Table 2.** Algorithm performance

	<b>Schizophrenia x healthy controls</b>	<b>Schizophrenia x unaffected siblings</b>	<b>Unaffected siblings x healthy controls</b>
<b>Accuracy</b>	79.7%	62.5%	75.5%
<b>Specificity</b>	79.1%	61.5%	72.0%
<b>Sensitivity</b>	80.4%	63.6%	75.5%
<b>PPV</b>	78.7%	58.3%	70.8%
<b>NPV</b>	80.8%	66.6%	76.5%

Note: Algorithm performance in identifying individuals with schizophrenia or unaffected siblings from healthy controls and patients with schizophrenia from unaffected siblings. PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.  $p < 0.05$  for all models.

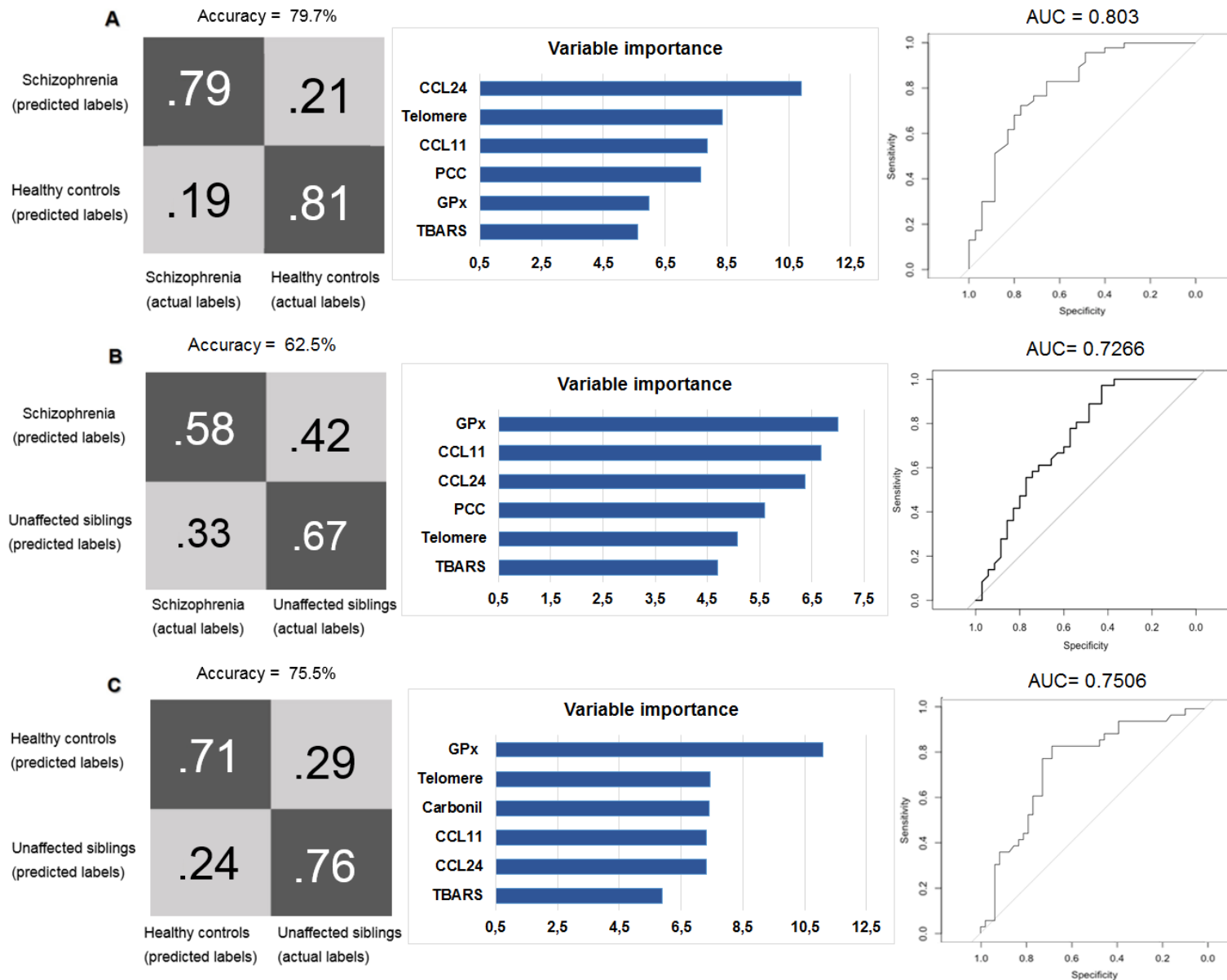


Fig. 1. A.B.C. Respectively, 'confusion matrix', bar graph with variable importance and receiver operating characteristic (ROC) curve for SZ vs HC (A), SZ vs SB (B) and SB vs HC (C). 'Confusion matrix' representing actual and predicted subjects for each comparison. ROC describing the algorithm's performance in differentiating SZ, SB and HC. Variable importance bar graph displays 'most relevant' biomarkers assigned by random forest algorithm for each comparison.



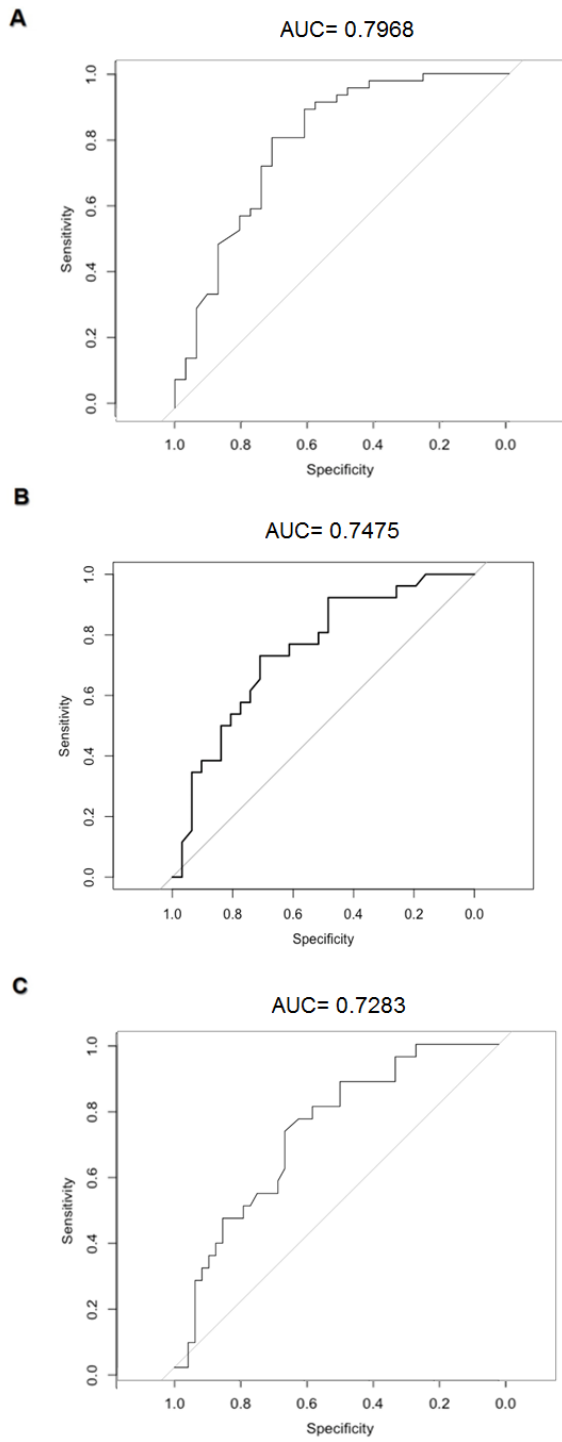


Fig. S1. Sensitivity analysis receiver operating characteristic (ROC) curve for SZ vs HC (A), SZ vs SB (B) and SB vs HC (C). ROC describing the algorithm's performance in differentiating SZ, SB and HC.

---

**Table S2.** Sensitivity analysis without multiple imputations

---

	<b>Schizophrenia x healthy controls</b>	<b>Schizophrenia x unaffected siblings</b>	<b>Unaffected siblings x healthy controls</b>
<b>Accuracy</b>	85.1%	70.9%	83.0%
<b>Specificity</b>	88.3%	70.9%	79.2%
<b>Sensitivity</b>	82.3%	70.9%	87.8%
<b>PPV</b>	89.4%	70.9%	76.6%
<b>NPV</b>	80.8%	70.9%	89.4%

---

Note: Algorithm performance without missing data in identifying individuals with schizophrenia or unaffected siblings from healthy controls and patients with schizophrenia from unaffected siblings. PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.  $p < 0.05$  for all models.

---

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi estudar a fisiopatologia do dano cognitivo e uma possível síndrome de envelhecimento acelerado na esquizofrenia a partir de estudos de endofenótipos incluindo irmãos saudáveis de indivíduos com a doença.

Em relação à cognição, avaliamos a correlação da memória verbal episódica com as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 e nos surpreendemos com os resultados. Tem-se evidências suficientes sugerindo desequilíbrio imunoinflamatório na esquizofrenia e, apesar de resultados heterogêneos, tem-se TNF- $\alpha$  e IL-6 como biomarcadores relevantes na fisiopatologia da doença. Além disto, tais citocinas estão diretamente ligadas com processos de consolidação de memória, como LTP e LTD. Portanto, a hipótese mais “óbvia” seria a de que tais marcadores teriam correlação direta com prejuízo no desempenho da memória, quanto maior os níveis das citocinas acima, maior a disfunção dos processos de memória e, conseqüentemente, pior desempenho cognitivo. Entretanto, no nosso estudo não encontramos associação significativa entre tais citocinas e desempenho cognitivo. Este resultado se mostrou interessante, pois reforça outra hipótese, a hipótese que coloca um mecanismo psicológico como fator unificador para potenciais processos de disfunção cognitiva na esquizofrenia. Tal teoria diz que os déficits ocorridos na memória verbal episódica seriam secundários a déficits em outras funções cognitivas, como o controle cognitivo proativo, e que tais funções cognitivas estariam disfuncionais pelo mau funcionamento de estruturas específicas, como o córtex pré-frontal dorso lateral. Assim sendo, estes resultados reforçam a hipótese de que prejuízos na memória verbal episódica na SZ podem ser reflexo de uma rede neural altamente desorganizada e inconsistente.

Importante dizer que, apesar de não se ter encontrado uma correlação positiva, achamos importante a publicação deste estudo, pois reforça uma outra teoria sobre o dano cognitivo na esquizofrenia. Isto torna os estudos científicos interessantes e empolgantes, visto que nem sempre o resultado obtido é o resultado esperado, fazendo-nos pensar além do “óbvio” e criar novas teorias.

Em relação ao envelhecimento patológico acelerado, fortalecemos e ampliamos dados da literatura que sugerem que ocorre na SZ um processo de envelhecimento acelerado, incorporando um modelo com biomarcadores periféricos relacionados com envelhecimento mais complexo, envolvendo eotaxinas (CCL-11 e CCL-24),

comprimento de telômero e marcadores de estresse oxidativo (TBARS, GPx, PCC). A ideia de envelhecimento acelerado patológico na esquizofrenia surgiu há aproximadamente 100 anos com Kraepelin e ganhou força nos últimos 10 anos após o estudo de Kirkpatrick, ficando cada vez mais consistente. Algumas constatações em sujeitos com SZ fortalecem esta teoria, pois são circunstâncias também relacionadas com o envelhecimento normal, sendo elas: a correlação com desfechos clínicos desfavoráveis, como por ex., doenças cardiovasculares e síndrome metabólica; uma expectativa de vida bem menor que a população geral; presença de declínio cognitivo e funcional importante; e alterações físicas relacionadas com envelhecimento, como afinamento do cabelo e diminuição de massa muscular. Nosso estudo corrobora com tal hipótese, pois encontramos uma boa acurácia (aproximadamente 80%) avaliando indivíduos com SZ e HC com o modelo de machine learning e marcadores inflamatórios periféricos potencialmente relacionados com envelhecimento. Isto significa que o algoritmo conseguiu identificar pacientes com SZ de HC com 80% de precisão, podendo-se sugerir dois aspectos a partir destes resultados: 1- que o envelhecimento acelerado patológico seria uma característica significativa o suficiente para ser identificada pelo modelo, tornando mais plausível a ideia de que este processo realmente ocorre na SZ; 2- que envelhecimento acelerado patológico possa ser uma manifestação endofenotípica da doença. Ademais, outra característica que fortifica o modelo é que o algoritmo também conseguiu diferenciar com boa acurácia irmãos não doentes dos pacientes de controles saudáveis. Isto é importante por dois motivos: 1- um dos critérios para uma característica ser classificada como endofenótipo é que tal característica também esteja presente em familiares não doentes dos pacientes; 2- que irmãos de indivíduos com SZ possam estar sofrendo algum grau de envelhecimento precoce e susceptível às suas possíveis consequências, como maior risco de doenças clínicas debilitantes. Apesar dos resultados encontrados, ainda não se tem esclarecido todos os mecanismos que ocorrem neste possível processo de envelhecimento precoce na esquizofrenia, tornando estudos nesta área de suma importância.

O melhor entendimento deste campo pode prover assinaturas multimodais para identificar sujeitos em risco para manifestações endofenotípicas e fornecer o substrato para intervenções precoces na tentativa de evitar futuros desfechos debilitantes. Por fim, o uso de novas abordagens estatísticas em pesquisa como machine learning, podem fornecer modelos preditivos com alta acurácia que vão ajudar decisões clínicas referentes ao tratamento, prevenção e prognóstico de doenças, visando melhorar os cuidados de

saúde.

## 9. REFERÊNCIAS

1. Crump C, Winkleby MA, Sundquist K, Sundquist J. Comorbidities and mortality in persons with schizophrenia: a Swedish national cohort study. *The American journal of psychiatry*. 2013;170(3):324-33.
2. Freedman R. Schizophrenia. *The New England journal of medicine*. 2003;349(18):1738-49.
3. Kraepelin E. *Dementia Praecox and Paraphrenia*. Huntington, New York. 1971;R.E. Krieger Pub. Co.
4. Reichenberg A. The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2010;12(3):383-92.
5. Kirkpatrick B, Messias E, Harvey PD, Fernandez-Egea E, Bowie CR. Is schizophrenia a syndrome of accelerated aging? *Schizophrenia bulletin*. 2008;34(6):1024-32.
6. Cohen CI, Murante T. A prospective analysis of the role of cognition in three models of aging and schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2018;196:22-8.
7. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia research*. 2009;110(1-3):1-23.
8. Lachance LR, McKenzie K. Biomarkers of gluten sensitivity in patients with non-affective psychosis: a meta-analysis. *Schizophrenia research*. 2014;152(2-3):521-7.
9. Khandaker GM, Zammit S, Lewis G, Jones PB. A population-based study of atopic disorders and inflammatory markers in childhood before psychotic experiences in adolescence. *Schizophrenia research*. 2014;152(1):139-45.
10. Khandaker GM, Dantzer R. Is there a role for immune-to-brain communication in schizophrenia? *Psychopharmacology*. 2016;233(9):1559-73.
11. Na KS, Jung HY, Kim YK. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2014;48:277-86.
12. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological psychiatry*. 2011;70(7):663-71.
13. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophrenia research*. 2008;102(1-3):1-18.
14. Coelewij L, Curtis D. Mini-review: Update on the genetics of schizophrenia. 2018;82(5):239-43.
15. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics C. Biological Insights

From 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci. *Nature*. 2014;511(7510):421-7.

16. McGrath JJ, Mortensen PB, Visscher PM, Wray NR. Where GWAS and epidemiology meet: opportunities for the simultaneous study of genetic and environmental risk factors in schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*. 2013;39(5):955-9.

17. Gottesman II. *Schizophrenia genesis: The origins of madness*. New York, NY, US: W H Freeman/Times Books/ Henry Holt & Co; 1991. xiii, 296-xiii, p.

18. Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O, McEwen S, et al. A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2016;65:185-94.

19. Popovic D, Benabarre A, Crespo JM, Goikolea JM, Gonzalez-Pinto A, Gutierrez-Rojas L, et al. Risk factors for suicide in schizophrenia: systematic review and clinical recommendations. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2014;130(6):418-26.

20. Kochunov P, Glahn DC, Rowland LM, Olvera RL, Winkler A, Yang YH, et al. Testing the hypothesis of accelerated cerebral white matter aging in schizophrenia and major depression. *Biological psychiatry*. 2013;73(5):482-91.

21. Lorenz WF. Sugar tolerance in dementia praecox and other mental disorders. *Archives of Neurology & Psychiatry*. 1922;8(2):184-96.

22. Langfeldt G. The insulin tolerance test in mental disorders. *Acta psychiatrica et neurologica Scandinavica Supplementum*. 1952;80:189-99.

23. Freeman H. Resistance to insulin in mentally disturbed soldiers. *Archives of neurology and psychiatry*. 1946;56(1):74-8.

24. Wang CJ, Zhang ZJ, Sun J, Zhang XB, Mou XD, Zhang XR, et al. Serum free Fatty acids and glucose metabolism, insulin resistance in schizophrenia with chronic antipsychotics. *Biological psychiatry*. 2006;60(12):1309-13.

25. Regenold WT, Thapar RK, Marano C, Gavirneni S, Kondapavuluru PV. Increased prevalence of type 2 diabetes mellitus among psychiatric inpatients with bipolar I affective and schizoaffective disorders independent of psychotropic drug use. *Journal of affective disorders*. 2002;70(1):19-26.

26. Mukherjee S, Schnur DB, Reddy R. Family history of type 2 diabetes in schizophrenic patients. *Lancet (London, England)*. 1989;1(8636):495.

27. Ryan MC, Collins P, Thakore JH. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naive patients with schizophrenia. *The American journal of psychiatry*. 2003;160(2):284-9.

28. Spelman LM, Walsh PI, Sharifi N, Collins P, Thakore JH. Impaired glucose tolerance in first-episode drug-naive patients with schizophrenia. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2007;24(5):481-5.

29. Yogaratnam J, Biswas N, Vadivel R, Jacob R. Metabolic complications of schizophrenia and antipsychotic medications--an updated review. *East Asian archives of*

psychiatry : official journal of the Hong Kong College of Psychiatrists = Dong Ya jing shen ke xue zhi : Xianggang jing shen ke yi xue yuan qi kan. 2013;23(1):21-8.

30. Mitchell AJ, Vancampfort D, Sweers K, van Winkel R, Yu W, De Hert M. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic abnormalities in schizophrenia and related disorders--a systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia bulletin*. 2013;39(2):306-18.

31. Malhotra N, Grover S, Chakrabarti S, Kulhara P. Metabolic syndrome in schizophrenia. *Indian journal of psychological medicine*. 2013;35(3):227-40.

32. McIntyre RS, Mancini DA, Basile VS. Mechanisms of antipsychotic-induced weight gain. *The Journal of clinical psychiatry*. 2001;62 Suppl 23:23-9.

33. Hayes RD, Downs J, Chang CK, Jackson RG, Shetty H, Broadbent M, et al. The effect of clozapine on premature mortality: an assessment of clinical monitoring and other potential confounders. *Schizophrenia bulletin*. 2015;41(3):644-55.

34. Enez Darcin A, Yalcin Cavus S, Dilbaz N, Kaya H, Dogan E. Metabolic syndrome in drug-naive and drug-free patients with schizophrenia and in their siblings. *Schizophrenia research*. 2015;166(1-3):201-6.

35. Medema S, Mocking RJ, Koeter MW, Vaz FM, Meijer C, de Haan L, et al. Levels of Red Blood Cell Fatty Acids in Patients With Psychosis, Their Unaffected Siblings, and Healthy Controls. *Schizophrenia bulletin*. 2016;42(2):358-68.

36. Tourjman V, Kouassi E, Koue ME, Rocchetti M, Fortin-Fournier S, Fusar-Poli P, et al. Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophrenia research*. 2013;151(1-3):43-7.

37. Passerieux C, Bulot V, Hardy-Bayle MC, Roux P. Assessing cognitive-related disability in schizophrenia: Reliability, validity and underlying factors of the evaluation of cognitive processes involved in disability in schizophrenia scale. *Disability and rehabilitation*. 2017:1-7.

38. WorldHealthOrganization. Global Burden of Disease Study 2015. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). 2016.

39. Krabbendam L, Arts B, van Os J, Aleman A. Cognitive functioning in patients with schizophrenia and bipolar disorder: a quantitative review. *Schizophrenia research*. 2005;80(2-3):137-49.

40. Bora E, Binnur Akdede B, Alptekin K. Neurocognitive impairment in deficit and non-deficit schizophrenia: a meta-analysis. *Psychological medicine*. 2017:1-14.

41. Keefe RS, Eesley CE, Poe MP. Defining a cognitive function decrement in schizophrenia. *Biological psychiatry*. 2005;57(6):688-91.

42. Kurtz MM, Wexler BE, Fujimoto M, Shagan DS, Seltzer JC. Symptoms versus neurocognition as predictors of change in life skills in schizophrenia after outpatient rehabilitation. *Schizophrenia research*. 2008;102(1-3):303-11.



43. Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the "right stuff"? *Schizophrenia bulletin*. 2000;26(1):119-36.
44. Ekerholm M, Firus Waltersson S, Fagerberg T, Soderman E, Terenius L, Agartz I, et al. Neurocognitive function in long-term treated schizophrenia: a five-year follow-up study. *Psychiatry research*. 2012;200(2-3):144-52.
45. Schaefer J, Giangrande E, Weinberger DR, Dickinson D. The global cognitive impairment in schizophrenia: consistent over decades and around the world. *Schizophrenia research*. 2013;150(1):42-50.
46. Tulving E. Episodic memory: from mind to brain. *Annual review of psychology*. 2002;53:1-25.
47. Czepielewski LS, Massuda R, Goi P, Sulzbach-Vianna M, Reckziegel R, Costanzi M, et al. Verbal episodic memory along the course of schizophrenia and bipolar disorder: a new perspective. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2015;25(2):169-75.
48. Frydecka D, Eissa AM, Hewedi DH, Ali M, Drapala J, Misiak B, et al. Impairments of working memory in schizophrenia and bipolar disorder: the effect of history of psychotic symptoms and different aspects of cognitive task demands. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014;8:416.
49. Li AW, Vinas-Guasch N, Hui CL, Chang WC, Chan SK, Lee EH, et al. Verbal working memory in schizophrenia: The role of syntax in facilitating serial recall. *Schizophrenia research*. 2017.
50. Valli I, Tognin S, Fusar-Poli P, Mechelli A. Episodic memory dysfunction in individuals at high-risk of psychosis: a systematic review of neuropsychological and neurofunctional studies. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(4):443-58.
51. Donzis EJ, Tronson NC. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;115:68-77.
52. Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. *Schizophrenia research*. 2008;106(2-3):89-107.
53. Goldsmith DR, Rapaport MH, Miller BJ. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular psychiatry*. 2016;21(12):1696-709.
54. Miller BJ, Gassama B, Sebastian D, Buckley P, Mellor A. Meta-analysis of lymphocytes in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological psychiatry*. 2013;73(10):993-9.
55. Ribeiro-Santos A, Lucio Teixeira A, Salgado JV. Evidence for an immune role on cognition in schizophrenia: a systematic review. *Current neuropharmacology*. 2014;12(3):273-80.

56. Mansur RB, Zugman A, Asevedo EM, da Cunha GR, Bressan RA, Brietzke E. Cytokines in schizophrenia: possible role of anti-inflammatory medications in clinical and preclinical stages. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2012;66(4):247-60.
57. Singh B, Bera NK, Nayak CR, Chaudhuri TK. Decreased serum levels of interleukin-2 and interleukin-6 in Indian Bengalee schizophrenic patients. *Cytokine*. 2009;47(1):1-5.
58. Teixeira AL, Gama CS, Rocha NP, Teixeira MM. Revisiting the Role of Eotaxin-1/CCL11 in Psychiatric Disorders. *Frontiers in psychiatry*. 2018;9:241.
59. Fillman SG, Weickert TW, Lenroot RK, Catts SV, Bruggemann JM, Catts VS, et al. Elevated peripheral cytokines characterize a subgroup of people with schizophrenia displaying poor verbal fluency and reduced Broca's area volume. *Molecular psychiatry*. 2016;21(8):1090-8.
60. Erhardt S, Schwieler L, Imbeault S, Engberg G. The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology*. 2017;112(Pt B):297-306.
61. Hosak L, Hakeem K, Raad M, Studnicka J. Is microvascular abnormality a new endophenotype in schizophrenia? *Psychiatria Danubina*. 2015;27(3):225-9.
62. Frodl T, Amico F. Is there an association between peripheral immune markers and structural/functional neuroimaging findings? *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2014;48:295-303.
63. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004;44(1):5-21.
64. Watanabe Y, Someya T, Nawa H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry and clinical neurosciences*. 2010;64(3):217-30.
65. McAfoose J, Baune BT. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2009;33(3):355-66.
66. Levin SG, Godukhin OV. Modulating Effect of Cytokines on Mechanisms of Synaptic Plasticity in the Brain. *Biochemistry Biokhimiia*. 2017;82(3):264-74.
67. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, behavior, and immunity*. 2011;25(2):181-213.
68. Camara ML, Corrigan F, Jaehne EJ, Jawahar MC, Anscomb H, Koerner H, et al. TNF-alpha and its receptors modulate complex behaviours and neurotrophins in transgenic mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(12):3102-14.
69. Prieto GA, Cotman CW. Cytokines and cytokine networks target neurons to modulate long-term potentiation. *Cytokine & growth factor reviews*. 2017;34:27-33.
70. Frydecka D, Misiak B, Pawlak-Adamska E, Karabon L, Tomkiewicz A, Sedlaczek P, et al. Interleukin-6: the missing element of the neurocognitive deterioration in schizophrenia? The focus on genetic underpinnings, cognitive impairment and clinical

manifestation. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2015;265(6):449-59.

71. Misiak B, Stanczykiewicz B, Kotowicz K, Rybakowski JK, Samochowiec J, Frydecka D. Cytokines and C-reactive protein alterations with respect to cognitive impairment in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review. *Schizophrenia research*. 2017.

72. Barch DM, Ceaser A. Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms. *Trends in cognitive sciences*. 2012;16(1):27-34.

73. Ray KL, Lesh TA, Howell AM, Salo TP, Ragland JD, MacDonald AW, et al. Functional network changes and cognitive control in schizophrenia. *NeuroImage Clinical*. 2017;15:161-70.

74. Lesh TA, Westphal AJ, Niendam TA, Yoon JH, Minzenberg MJ, Ragland JD, et al. Proactive and reactive cognitive control and dorsolateral prefrontal cortex dysfunction in first episode schizophrenia. *NeuroImage Clinical*. 2013;2:590-9.

75. Fassbender C, Scangos K, Lesh TA, Carter CS. RT distributional analysis of cognitive-control-related brain activity in first-episode schizophrenia. *Cognitive, affective & behavioral neuroscience*. 2014;14(1):175-88.

76. Czepielewski LS, Massuda R, Panizzutti B, Grun LK, Barbe-Tuana FM, Teixeira AL, et al. Telomere Length and CCL11 Levels are Associated With Gray Matter Volume and Episodic Memory Performance in Schizophrenia: Evidence of Pathological Accelerated Aging. *Schizophrenia bulletin*. 2018.

77. Sartori JM, Reckziegel R, Passos IC, Czepielewski LS, Fijtman A, Sodre LA, et al. Volumetric brain magnetic resonance imaging predicts functioning in bipolar disorder: A machine learning approach. *Journal of psychiatric research*. 2018;103:237-43.

78. PD HPD, JB RJB. Cognitive and functional deficits in people with schizophrenia: Evidence for accelerated or exaggerated aging? 2017.

79. Harvey PD, Rosenthal JB. Cognitive and functional deficits in people with schizophrenia: Evidence for accelerated or exaggerated aging? *Schizophrenia research*. 2017.

80. Shivakumar V, Kalmady SV, Venkatasubramanian G, Ravi V, Gangadhar BN. Do schizophrenia patients age early? *Asian journal of psychiatry*. 2014;10:3-9.

81. Lindqvist D, Epel ES, Mellon SH, Penninx BW, Revesz D, Verhoeven JE, et al. Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2015;55:333-64.

82. Polho GB, De-Paula VJ, Cardillo G, dos Santos B, Kerr DS. Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophrenia research*. 2015;165(2-3):195-200.

83. Hong S, Lee EE, Martin AS, Soontornniyomkij B, Soontornniyomkij V, Achim

CL, et al. Abnormalities in chemokine levels in schizophrenia and their clinical correlates. *Schizophrenia research*. 2017;181:63-9.

84. Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011;477(7362):90-4.

85. Asevedo E, Gadelha A, Noto C, Mansur RB, Zugman A, Belangero SI, et al. Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition in individuals with schizophrenia. *Journal of psychiatric research*. 2013;47(10):1376-82.

86. Sertan Copoglu U, Virit O, Hanifi Kokacya M, Orkmez M, Bulbul F, Binnur Erbagci A, et al. Increased oxidative stress and oxidative DNA damage in non-remission schizophrenia patients. *Psychiatry research*. 2015;229(1-2):200-5.

87. Sawa A, Sedlak TW. Oxidative stress and inflammation in schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2016;176(1):1-2.

88. Okusaga OO. Accelerated aging in schizophrenia patients: the potential role of oxidative stress. *Aging and disease*. 2014;5(4):256-62.

89. Rao S, Kota LN, Li Z, Yao Y, Tang J, Mao C, et al. Accelerated leukocyte telomere erosion in schizophrenia: Evidence from the present study and a meta-analysis. *Journal of psychiatric research*. 2016;79:50-6.

90. Gottesman, II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *The American journal of psychiatry*. 2003;160(4):636-45.

91. Goldstein BL, Klein DN. A review of selected candidate endophenotypes for depression. *Clinical psychology review*. 2014;34(5):417-27.

92. Pearlson GD. Etiologic, phenomenologic, and endophenotypic overlap of schizophrenia and bipolar disorder. *Annual review of clinical psychology*. 2015;11:251-81.

93. Smeland OB, Frei O, Kauppi K, Hill WD, Li W, Wang Y, et al. Identification of Genetic Loci Jointly Influencing Schizophrenia Risk and the Cognitive Traits of Verbal-Numerical Reasoning, Reaction Time, and General Cognitive Function. *JAMA psychiatry*. 2017;74(10):1065-75.

94. Li Z, Chen J, Yu H, He L, Xu Y, Zhang D, et al. Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia. 2017;49(11):1576-83.

95. Massuda R, Pedrini M, Reckziegel R, Costanzi M, Ferrari P, Gubert C, et al. Elevated serum protein oxidative stress in siblings of patients with schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2013;147(2-3):398-9.

96. Czepielewski LS, Massuda R, Panizzutti B, da Rosa ED, de Lucena D, Macedo D, et al. Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging. *Schizophrenia research*. 2016;174(1-3):39-42.

97. Quee PJ, Alizadeh BZ, Aleman A, van den Heuvel ER. Cognitive subtypes in non-affected siblings of schizophrenia patients: characteristics and profile congruency with affected family members. *Psychological medicine*. 2014;44(2):395-405.
98. Snitz BE, Macdonald AW, 3rd, Carter CS. Cognitive deficits in unaffected first-degree relatives of schizophrenia patients: a meta-analytic review of putative endophenotypes. *Schizophrenia bulletin*. 2006;32(1):179-94.
99. Massuda R, Bucker J, Czepielewski LS, Narvaez JC, Pedrini M, Santos BT, et al. Verbal memory impairment in healthy siblings of patients with schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2013;150(2-3):580-2.
100. Liu C, Xue Z, Palaniyappan L, Zhou L, Liu H, Qi C, et al. Abnormally increased and incoherent resting-state activity is shared between patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Schizophrenia research*. 2016;171(1-3):158-65.
101. Zalesky A, Pantelis C, Cropley V, Fornito A, Cocchi L, McAdams H, et al. Delayed Development of Brain Connectivity in Adolescents With Schizophrenia and Their Unaffected Siblings. *JAMA psychiatry*. 2015;72(9):900-8.
102. Chang X, Shen H, Wang L, Liu Z, Xin W, Hu D, et al. Altered default mode and fronto-parietal network subsystems in patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Brain research*. 2014;1562:87-99.
103. Collin G, Kahn RS, de Reus MA, Cahn W, van den Heuvel MP. Impaired rich club connectivity in unaffected siblings of schizophrenia patients. *Schizophrenia bulletin*. 2014;40(2):438-48.
104. Ross RG, Freedman R. Endophenotypes in Schizophrenia for the Perinatal Period: Criteria for Validation. *Schizophrenia bulletin*. 2015;41(4):824-34.
105. Braff DL. The importance of endophenotypes in schizophrenia research. *Schizophrenia research*. 2015;163(1-3):1-8.
106. Lantz B. *Machine Learning with R*. 2nd ed. Packt Publishing. 2015.
107. Passos IC, Mwangi B, Kapczinski F. Big data analytics and machine learning: 2015 and beyond. *The lancet Psychiatry*. 2016;3(1):13-5.
108. Kang J, Schwartz R, Flickinger J, Beriwal S. Machine Learning Approaches for Predicting Radiation Therapy Outcomes: A Clinician's Perspective. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015;93(5):1127-35.
109. Gupta S, Tran T, Luo W, Phung D, Kennedy RL, Broad A, et al. Machine-learning prediction of cancer survival: a retrospective study using electronic administrative records and a cancer registry. *BMJ open*. 2014;4(3):e004007.
110. Chen Y, Sun J, Huang LC, Xu H, Zhao Z. Classification of Cancer Primary Sites Using Machine Learning and Somatic Mutations. *BioMed research international*. 2015;2015:491502.
111. Kessler RC, van Loo HM, Wardenaar KJ, Bossarte RM, Brenner LA, Cai T, et al.

Testing a machine-learning algorithm to predict the persistence and severity of major depressive disorder from baseline self-reports. *Molecular psychiatry*. 2016;21(10):1366-71.

112. Lueken U, Straube B, Yang Y, Hahn T, Beesdo-Baum K, Wittchen HU, et al. Separating depressive comorbidity from panic disorder: A combined functional magnetic resonance imaging and machine learning approach. *Journal of affective disorders*. 2015;184:182-92.

113. Passos IC, Mwangi B, Cao B, Hamilton JE, Wu MJ, Zhang XY, et al. Identifying a clinical signature of suicidality among patients with mood disorders: A pilot study using a machine learning approach. *Journal of affective disorders*. 2016;193:109-16.

114. Chung Y, Addington J, Bearden CE, Cadenhead K, Cornblatt B, Mathalon DH, et al. Use of Machine Learning to Determine Deviance in Neuroanatomical Maturity Associated With Future Psychosis in Youths at Clinically High Risk. *JAMA psychiatry*. 2018.

115. Koutsouleris N, Kahn RS, Chekroud AM, Leucht S, Falkai P, Wobrock T, et al. Multisite prediction of 4-week and 52-week treatment outcomes in patients with first-episode psychosis: a machine learning approach. *The lancet Psychiatry*. 2016;3(10):935-46.

116. Mothi SS, Sudarshan M, Tandon N, Tamminga C, Pearlson G, Sweeney J, et al. Machine learning improved classification of psychoses using clinical and biological stratification: Update from the bipolar-schizophrenia network for intermediate phenotypes (B-SNIP). *Schizophrenia research*. 2018.

117. Schnack HG. Improving individual predictions: Machine learning approaches for detecting and attacking heterogeneity in schizophrenia (and other psychiatric diseases). *Schizophrenia research*. 2017.

118. Rozycki M, Satterthwaite TD, Koutsouleris N, Erus G, Doshi J, Wolf DH, et al. Multisite Machine Learning Analysis Provides a Robust Structural Imaging Signature of Schizophrenia Detectable Across Diverse Patient Populations and Within Individuals. *Schizophrenia bulletin*. 2017.

119. Koutsouleris N, Wobrock T, Guse B, Langguth B, Landgrebe M, Eichhammer P, et al. Predicting Response to Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in Patients With Schizophrenia Using Structural Magnetic Resonance Imaging: A Multisite Machine Learning Analysis. *Schizophrenia bulletin*. 2017.

120. Benedict RHB, Schretlen D, Groninger L, Brandt J. Hopkins Verbal Learning Test – Revised: Normative Data and Analysis of Inter-Form and Test-Retest Reliability. *The Clinical Neuropsychologist*. 1998;12(1):43-55.

121. Pedrini M, Massuda R, de Lucena D, Macedo D, Paz AV, Lobato MI, et al. Differences in eotaxin serum levels patients with recent onset and in chronic stable schizophrenia: a clue for understanding accelerating aging profile. *Schizophrenia research*. 2014;152(2-3):528-9.

122. Kuhn M. *Building Predictive Models in R Using the caret Package*. 2008.

2008;28(5):26.

123. Mwangi B, Tian TS, Soares JC. A review of feature reduction techniques in neuroimaging. *Neuroinformatics*. 2014;12(2):229-44.

124. Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2006;30(3):512-5.

125. Johnston BA, Mwangi B, Matthews K, Coghill D, Konrad K, Steele JD. Brainstem abnormalities in attention deficit hyperactivity disorder support high accuracy individual diagnostic classification. *Human brain mapping*. 2014;35(10):5179-89.